

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Proteasas, citoesqueleto de actina y permeabilidad de la membrana de la célula
hospedera durante las fases tardías del ciclo intracelular de *Trypanosoma cruzi*

Disertación Previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

ZAÍRA ANAÍD RIVADENEIRA VILLACÍS

QUITO, 2016

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas, de la Srta. Zaíra Anaíd Rivadeneira Villacís ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Jaime Costales, Ph. D.

DIRECTOR DE LA DISERTACIÓN

Quito, marzo del 2016

AGRADECIMIENTOS

A Jaime Costales, mi tutor, por su disposición y paciencia invalorable desde el inicio hasta el final de este proyecto.

A Carolina Crespo, por su apoyo incondicional en los momentos que más necesité para la realización de este estudio.

A Saúl Aguirre, por su inmenso impulso para la consecución de este propósito y por el más importante aporte en el mismo.

A Fernanda Latorre por toda su enseñanza, su ayuda, amistad y cariño desde que entré en el Centro de Enfermedades Infecciosas y Crónicas.

A Gabriela Valenzuela, Andrea Poveda, Andrés Núñez, Elizabeth Veloz, Claudia Vera, Camila Cilveti, Andrea Rodriguez, Vanesa Ayala, Daniel Zurita, Juan Carlos Torres, Daniela Guerra, Nathaly Espinel, Belén Andrango y Cristopher García por brindarme su amistad, impulso y cariño.

A mis padres y toda mi familia por su motivación y constante estímulo brindados a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Al Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Crónicas (CIEIC) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, PUCE; así como a sus autoridades y administración, por permitirme desarrollar esta investigación en sus instalaciones.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABLAS.....	XII
LISTA DE ANEXOS.....	XV
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	3
3.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE TRIPANOSOMIASIS AMERICANA ...	4
3.2.1. Fases de la tripanosomiasis americana	4
3.2.2. Formas de la tripanosomiasis americana	5
3.3. CICLO DE VIDA DE <i>T. cruzi</i>	6
3.4. INVASIÓN CELULAR DE <i>T. cruzi</i>	6
3.5. EGRESO CELULAR DE <i>T. cruzi</i>	7
3.6. PROTEASAS E INHIBIDORES DE PROTEASAS EN EL EGRESO DE <i>T. cruzi</i>	8
3.7. AGENTES DESPOLIMERIZANTES DE ACTINA EN EL EGRESO DE <i>T. cruzi</i>	8
3.8. OBJETIVOS	9
3.9. JUSTIFICACIÓN	10

4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. CÉLULAS Y PARÁSITOS - TRIPOMASTIGOTES.....	11
4.1.1. Mantenimiento de células.....	11
4.1.2. Propagación de tripomastigotes.....	12
4.2. PREPARACIÓN DE PLACAS DE EXPERIMENTACIÓN.....	12
4.3. INFECCIÓN CELULAR EN PLACAS DE 6 Y 96 POCILLOS.....	13
4.4. CUANTIFICACIÓN DE FORMAZÁN.....	14
4.5. TINCIONES DE FLUORESCENCIA	14
4.6. OBSERVACIÓN DE LOS CUBREOBJETOS EN EL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA	16
4.7. ESTANDARIZACIÓN DEL KIT CELLTITER PARA MEDIR ABSORBANCIA CUANTIFICAR TRIPOMASTIGOTES.....	16
4.8. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LA CITOCALASINA D EN TRIPOMASTIGOTES DE <i>T. cruzi</i>	16
4.9. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS ANTIPAÍNA Y FOSFORAMIDÓN EN CÉLULAS LLc-MK ₂	17
4.10. EXPERIMENTO DE EGRESO CELULAR DEL PARÁSITO EN PLACAS TRATADAS CON LOS REACTIVOS ANTIPAÍNA, FOSFORAMIDÓN Y CITOCALASINA – D.....	17
4.11. PERMEABILIDAD DE CÉLULAS INFECTADAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SAPONINA.....	18
4.12. PERMEABILIDAD DE CÉLULAS INFECTADAS TRATADAS CON MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS INFECTADAS Y CÉLULAS NO INFECTADAS	19

4.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	19
5. RESULTADOS	20
5.1. TINCIONES DE FLUORESCENCIA	20
5.2. ESTANDARIZACIÓN DEL KIT CELLTITER PARA MEDIR ABSORBANCIA DE TRIPOMASTIGOTES	20
5.3. TOXICIDAD DE LA CITOCALASINA EN TRIPOMASTIGOTES	21
5.4. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS EN CÉLULAS LLc-MK ₂	21
5.5. DESPOLIMERIZACIÓN DE LA ACTINA Y EGRESO CELULAR DEL PARÁSITO.....	22
5.6. EXPERIMENTO DE EGRESO CELULAR DEL PARÁSITO EN PLACAS TRATADAS CON LOS REACTIVOS ANTIPAÍNA, FOSFORAMIDÓN	22
5.7. EFECTO DE LA PERMEABILIDAD EXPERIMENTAL DE CÉLULAS INFECTADAS SOBRE EL EGRESO CELULAR	24
5.8. PERMEABILIDAD DE CÉLULAS INFECTADAS TRATADAS CON MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS INFECTADAS Y CÉLULAS NO INFECTADAS	24
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	26
7. RECOMENDACIONES	32
8. LITERATURA CITADA.....	33
9. FIGURAS	38
10. TABLAS	53
11. ANEXOS	85

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ANOVA	Análisis de varianza
ANT	Antipaína
BSA	Albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumine)
CYT – D	Citocalasina – D
DAPI	4', 6' - Diamidino - 2 – Fenilindol tinte para ácidos nucleicos
DMEM	Medio de cultivo celular modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
FBS	Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)
FOSF	Fosforamidón
HR	Humedad relativa
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLc-MK ₂	Células epiteliales de riñón de mono (Rhesus monkey kidney epithelial cells)
L929	Fibroblastos de ratón cepa L929
PBS	Tampón salino de fosfato (Phosphate Buffered Saline)
SAP	Saponina al 1%

SPSS	Programa de análisis estadístico “Statistical Package for the Social Sciences”
TBS	Solución salina tamponada con tris (Tris Buffer saline solution)
β – GAL	Beta galactosidasa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parásitos de <i>T. cruzi</i> infectando fibroblastos L929	39
Figura 2. Fibroblastos L929 infectados con <i>T. cruzi</i> , día 5 post infección.....	40
Figura 3. Fibroblastos L929 infectados con <i>T. cruzi</i> , en día 7 post infección.....	41
Figura 4. Filamentos de actina en fibroblastos L929 infectados.	42
Figura 5. Filamentos de actina en un fibroblasto L929 no infectado.	43
Figura 6. Curva de titulación de cantidad de parásitos con el kit CellTiter	44
Figura 7. Toxicidad de la citocalasina sobre tripomastigotes.....	45
Figura 8. Citotoxicidad de la antipaína sobre células LLc-MK ₂	46
Figura 9. Citotoxicidad del fosforamidón sobre células LLc-MK ₂	47
Figura 10. Permeabilidad celular como indicador de egreso de <i>T. cruzi</i> en células tratadas con citocalasina.....	48
Figura 11. Permeabilidad celular como indicador de egreso de <i>T. cruzi</i> en células tratadas con fosforamidón.....	49
Figura 12. Permeabilidad celular como indicador de egreso de <i>T. cruzi</i> en células tratadas con antipaína.....	50
Figura 13. Permeabilidad de células infectadas y no infectadas tratadas con saponina.....	51
Figura 14. Permeabilidad en células tratadas con medio de cultivo de células infectadas y no infectadas	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con antipaína en células LLc-MK ₂ para 24 horas.	54
Tabla 2. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con antipaína en células LLc-MK ₂ para 48 horasr.	55
Tabla 3. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con antipaína en células LLc-MK ₂ para 72 horas	56
Tabla 4. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de toxicidad en células tratadas con antipaína a las 48 horas.....	57
Tabla 5. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de toxicidad en células tratadas con antipaína a las 72 horas.....	58
Tabla 6. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con fosforamidón en células LLc-MK ₂ para 24 horas.	59
Tabla 7. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con fosforamidón en células LLc-MK ₂ para 48 horas.	60
Tabla 8. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con fosforamidón en células LLc-MK ₂ para 72 horas.	61
Tabla 9. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin citocalasina al día 5 post infección.	62
Tabla 10. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin citocalasina al día 6 post infección.	63
Tabla 11. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin citocalasina al día 7 post infección.	64

Tabla 12. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con citocalasina en el día 5 post tratamiento	65
Tabla 13. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con citocalasina en el día 6 post infección.	66
Tabla 14. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con citocalasina en el día 7 post infección	67
Tabla 15. Diferencia del porcentaje de toxicidad en células infectadas tratadas con citocalasina	68
Tabla 16. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin antipaína al día 5 post infección	69
Tabla 17. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin antipaína al día 6 post infección.	70
Tabla 18. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin antipaína al día 7 post infección.	71
Tabla 19. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con antipaína en el día 5 post infección.....	72
Tabla 20. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con antipaína en el día 6 post infección.....	73
Tabla 21. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con antipaína en el día 7 post infección.....	74
Tabla 22. Diferencia del porcentaje de toxicidad en células infectadas tratadas con antipaína.	75
Tabla 23. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin fosforamidón al día 5 post infección.	76

Tabla 24. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin fosforamidón al día 6 post infección	77
Tabla 25. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin fosforamidón al día 7 post infección	78
Tabla 26. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con fosforamidón en el día 5 post infección.....	79
Tabla 27. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con fosforamidón en el día 6 post infección.....	80
Tabla 28. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con fosforamidón en el día 7 post infección.....	81
Tabla 29. Diferencia del porcentaje de toxicidad en células infectadas tratadas con fosforamidón.....	82
Tabla 30. Prueba ANOVA para determinación de permeabilidad en células infectadas tratadas con medio de cultivo de células infectadas y medio de células no infectadas.....	83
Tabla 31. Prueba de significación Tukey para determinación de permeabilidad en células infectadas tratadas con medio de cultivo de células infectadas y medio de células no infectadas.	84

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Epidemiología de la enfermedad de Chagas.....	86
Anexo 2. Vector de la enfermedad de Chagas.....	87
Anexo 3. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	88
Anexo 4. Mapa de la placa con células infectadas y no infectadas	89
Anexo 5. Mapa de la placa para titulación de tripomastigotes con el kit CellTiter.....	90
Anexo 6. Mapa de placa para toxicidad de citocalasina en tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	91
Anexo 7. Mapa de la placa para prueba de toxicidad, células tratadas con antipaína y fosforamidón.....	92
Anexo 8. Mapa de células infectadas para experimento de egreso celular, tratada con antipaína, fosforamidón o citocalasina.	93
Anexo 9. Medio de cultivo adicionado con saponina al 0,05% en peso: volumen	94
Anexo 10. Mapa de células infectadas para experimento con saponina	95
Anexo 11. Mapa de células infectadas para experimento con medio de cultivo de frascos de células infectadas y no infectadas.....	96
Anexo 12. Placa de experimento para egreso celular, células infectadas tratada con antipaína.	97
Anexo 13. Placa de experimento para egreso celular, células infectadas tratada con citocalasina	98

1. RESUMEN

La tripanosomiasis americana, mejor conocida como enfermedad de Chagas, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, es uno de los padecimientos más importantes a nivel de las regiones tropicales y subtropicales de América Latina. *T. cruzi* presenta tres diferentes estadios durante su ciclo de vida: epimastigotes, que se replican en el tracto digestivo chinches hematófagos de la familia Reduviidae; tripomastigotes, formas infectivas del parásito, las mismas que son capaces de invadir células de mamífero; y finalmente, amastigotes que son formas replicativas intracelulares en mamíferos. En este estudio, nos concentramos en la fase final de la infección intracelular con *T. cruzi*, analizando eventos relacionados al egreso de tripomastigotes una vez que se completa el ciclo intracelular de multiplicación en células de mamífero. Evaluamos el rol de las proteasas en el proceso de egreso celular, con el uso de inhibidores específicos para estas enzimas; además de las afecciones causadas por el protozoo en el citoesqueleto de actina. Reportamos que la actividad de proteasas de cisteína está involucrada en el proceso de egreso celular durante las fases finales del ciclo del parásito. Nuestros resultados muestran que la antipaína es un inhibidor más eficiente del de egreso que el fosforamidón. Por otra parte, los microfilamentos de actina presentan alteraciones estructurales en las fases finales del ciclo intracelular y agentes despolimerizantes de actina promueven el proceso de egreso del parásito afectando a la membrana celular. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para caracterizar más a profundidad los eventos celulares involucrados en el egreso celular de *T. cruzi*, así como los efectos que las fases tardías del ciclo celular del parásito tienen sobre las células hospederas.

Palabras clave: Citoesqueleto, Egreso celular, Membrana, Proteasas, *Trypanosoma cruzi*.

2. ABSTRACT

American trypanosomiasis, commonly known as Chagas disease, is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, and constitutes one of the most important infectious diseases in tropical and subtropical regions of Latin America. The parasite possesses three different developmental stages. Namely, epimastigote, which replicates in the digestive tract of the bloodsucking bug from the Reduviidae family; tripomastigote, which is the infective form of the parasite and is capable of invading mammal cells; and amastigote, the intracellular replicative form in mammals. In this study, we focused on the final phase of the intracellular infection with *T. cruzi*, analyzing the cellular egress tripomastigotes upon completion of the intracellular cycle in mammalian cells. We evaluated the role of the proteases in the process as well as actin cytoskeleton alterations induced by the parasite. Here we report that cysteine proteases are involved in the cellular egress process and antipain is a better inhibitor in the egress process than phosphoramidon. Additionally, actin microfilaments showed structural alterations during late stages of intracellular development of the parasite, and, actin depolymerizing promote *T. cruzi* egress by altering the cellular membrane. However, additional studies are necessary to gain better understanding of the cellular events involved in *T. cruzi*'s cellular egress and the effects that the late intracellular phase stages exerts over the host cells.

Key words: Cellular egress, Cytoskeleton, Membrane, Proteases, *Trypanosoma cruzi*

3. INTRODUCCIÓN

3.1. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Trypanosoma cruzi es un parásito intracelular estricto, causante del mal de Chagas, pertenece al grupo de los Euglenozoos, filo Kinetoplástida orden Trypanosomatidae (Brusca & Brusca, 2005). Esta enfermedad es uno de los padecimientos más importantes y olvidados de las regiones tropicales y subtropicales de Latino América. Se estima que alrededor de 7 a 8 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* (Anexo 1) (OPS, 2015).

Esta enfermedad es también conocida como tripanosomiasis americana por ser endémica de esta zona y se distribuye desde México hasta Sudamérica, sin embargo también se han encontrado casos en Estados Unidos. La transmisión natural se da con mayor frecuencia en zonas rurales donde habita gente pobre que está en contacto directo con los vectores (Triatominos de la familia Reduviidae) (Anexo 2), si bien se reportan casos introducidos de la enfermedad en Norte América, Europa, Australia y Asia (Esper *et al.*, 2014).

La tripanosomiasis americana fue descubierta en 1909 por el médico Brasileño Carlos Chagas y después de los estudios realizados sobre la enfermedad, se reconoció al primer caso reportado. Sin embargo estudios de paleo-parasitología demuestran que la enfermedad afectaba al ser humano desde hace más de 9000 años (Rassi & Marin-Neto, 2010).

3.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

Las manifestaciones clínicas de este padecimiento se dividen en dos fases principales: aguda y crónica. Además presenta las formas cardíaca y digestiva, según los órganos afectados por el agente infeccioso (Esper *et al.*, 2014).

3.2.1. Fases de la tripanosomiasis americana

La fase aguda dura de 4 a 8 semanas y generalmente es asintomática, los síntomas se presentan al inicio entre 8 a 10 días después del contacto con el parásito e incluyen fiebre, malestar general, hepatosplenomegalia (agrandamiento del hígado y del bazo), linfadenopatía (inflamación de los nódulos linfáticos), meningoencefalitis que se da generalmente en niños menores de 2 años y edema subcutáneo (erupción en el punto de infección). Además, en esta fase también se puede presentar el signo de Romaña, que es la inflamación palpebral unilateral que ocurre en caso de que el paciente haya inoculado las heces del triatomino, conteniendo el agente infeccioso, en su ojo (Esper *et al.*, 2014).

La fase crónica empieza aproximadamente 60 días después de la infección inicial. Esta fase tiene la característica de presentar una disminución drástica de los parásitos en la sangre, asociada con el inicio de la respuesta inmune adaptativa y los síntomas pueden desaparecer aunque la enfermedad no haya sido tratada (Esper *et al.*, 2014). Durante esta fase, distintos tipos de arritmia pueden darse debido a bloqueos del sistema de conducción, y fibrilación atrial. Los síntomas incluyen síncope (pérdida del conocimiento por paralización momentánea del corazón y el sistema respiratorio), palpitaciones y dolor en el pecho (Esper *et al.*, 2014). Esta fase se inicia de dos a tres meses después de la infección

inicial, del 40% al 30% de pacientes infectados muestran fuertes manifestaciones de los síntomas antes mencionados, mientras que el resto (60% y 70%) pueden permanecer sin mostrar síntomas (Rassi & Marcondes de Rezende, 2012).

3.2.2. Formas de la tripanosomiasis americana

La forma digestiva muestra alteraciones en el esófago y en general el tracto digestivo alterando sus funciones. Los mega-síndromes (agrandamiento de órganos) resultan de la destrucción de los ganglios del sistema nervioso y alteran la función motora de los órganos afectados, los segmentos más comprometidos son el esófago y el colon, gatillando el aumento de volumen de los mismos y generando mega-esófago o mega-colon respectivamente; estos síndromes son poco observados en niños, mientras que adultos y adolescentes los presentan más recurrentemente (Esper *et al.*, 2014).

La forma cardíaca por su parte, es la manifestación más frecuente de la enfermedad de Chagas, se desarrolla en el 20% y 30% de los individuos infectados. Los síntomas incluyen aneurismas, fallas cardíacas generales, tromboembolia, taquicardia y muerte súbita. Dentro de los casos que presentan la forma cardíaca, las muertes por tromboembolia son del 10% al 15% de los casos y del 25% al 30% son por fallas generales en el corazón. Además, es importante mencionar que la muerte súbita puede ocurrir también en pacientes que previamente fueron asintomáticos (Rassi & Marcondes de Rezende, 2012).

3.3. CICLO DE VIDA DE *T. cruzi*

T. cruzi exhibe un ciclo de vida complejo (Anexo 3), pues presenta diferentes estadios de desarrollo en los insectos vectores y en los hospederos mamíferos. Cuando el triatomino se alimenta de la sangre de un hospedero infectado con tripomastigotes, éstos se transforman en epimastigotes (primera forma replicativa) en el tracto digestivo del vector y posteriormente toman la forma de tripomastigotes metacíclicos en la sección final del intestino del triatomino. Los parásitos en su forma infectiva son liberados en las heces del chinche inmediatamente después de que este se alimenta; e invaden al nuevo hospedero mamífero a través de mucosas expuestas o en las heridas resultantes de la picadura del insecto (Rassi & Marcondes de Rezende, 2012). Una vez dentro del mamífero, los tripomastigotes metacíclicos (forma infectiva) invaden tejido endotelial y conectivo para posteriormente diferenciarse en amastigotes (Figura 1A) (segunda forma replicativa) y reproducirse por fisión binaria dentro de cualquier tipo de células nucleadas que son potenciales objetivos de infección para *T. cruzi* (Rassi & Marin-Neto, 2010).

Cuando la célula hospedera está llena de amastigotes, estos se transforman nuevamente en tripomastigotes (Figura 1B), que egresan irán a nuevas células cercanas y/o se trasladarán a través de vasos sanguíneos o linfáticos, pudiendo ser capturados nuevamente por otro triatomino y continuar con el ciclo de vida (Tyler & Engman, 2001).

3.4. INVASIÓN CELULAR DE *T. cruzi*

T. cruzi, por su condición de ser un parásito intracelular estricto, tiene la necesidad de infectar, replicarse y salir varias veces de diferentes tipos de células tales como

fibroblastos, macrófagos y células musculares estriadas y lisas durante el proceso de infección de un hospedero (Andrade & Andrews, 2005). Durante la invasión celular, los tripomastigotes pueden entrar mediante el reconocimiento específico de receptores (Palau, 2000). El parásito infecta las células usando a su favor glicoproteínas y lisosomas celulares, proteasas y agonistas (sustancias capaces de unirse a los receptores celulares), para facilitar su entrada (Burleigh & Woolsey, 2002). Además deben activar varias rutas de señalización molecular como el intercambio de iones de calcio a través de la membrana, el AMP cíclico y la activación de quinasas del fosfatidilinositol – 3, PI3K (Mott & Burleigh, 2009).

La fase de ingreso se da simultáneamente con la formación de una vacuola parasitófora, producida gracias al reclutamiento de los lisosomas de las células hospederas y la fusión con la membrana plasmática. El escape desde la vacuola parasitófora, es facilitado por la actividad lítica de la toxina TC-TOX secretada por el parásito y su función es formar poros en la misma sin afectar a la membrana del agente infeccioso ni la de la célula huésped (Palau, 2000).

3.5. EGRESO CELULAR DE *T. cruzi*

Después de los ciclos de replicación del protozoo en el citoplasma, sucede el egreso celular, el cual conlleva a la liberación de la progenie de parásitos originada en una sola célula (Friedrich *et al.*, 2012). Se cree que para el egreso el parásito necesita de otros factores que le permitan atravesar la membrana plasmática; además es posible que sea necesario desestabilizar el citoesqueleto de la célula y se ha sugerido que efectores moleculares como proteasas, lipasas y proteínas formadoras de poros estén involucradas en este proceso, se cree que las proteínas formadoras de poros, por ejemplo, podrían afectar la integridad de la

membrana plasmática e inducen la muerte celular. Alternativamente, las lipasas contribuirán con en el rompimiento de la misma (Friedrich *et al.*, 2012).

3.6. PROTEASAS E INHIBIDORES DE PROTEASAS EN EL EGRESO DE *T. cruzi*

Las proteasas son enzimas que catalizan procesos de hidrólisis y pueden degradar enlaces peptídicos incluidos los del citoesqueleto y las proteínas inter-membrana. Existen cinco tipos de proteasas (de serina, treonina, aspartato, cisteína y metaloproteasas) (Chapman *et al.*, 1997). Las proteasas de cisteínas permiten a los parásitos evadir el sistema inmune, ser virulentos, invadir tejidos y células (McKerrow *et al.*, 2013). Los inhibidores de proteasas funcionan limitando o eliminando las funciones de estas enzimas. Estudios previos han demostrado que inhibidores de proteasas de cisteína como la antipaína podría potencialmente aumentar el tiempo de permanencia intracelular y disminuir el número de parásitos en el egreso de *T. cruzi* (Aguinaga, 2013).

3.7. AGENTES DESPOLIMERIZANTES DE ACTINA EN EL EGRESO DE *T. cruzi*

Algunos estudios postulan que los microfilamentos de actina forman una barrera para la unión de los lisosomas con la membrana e impiden la formación de la vacuola parasitófora en la fase de infección celular. Por lo tanto agentes despolimerizantes de los filamentos de actina pueden promover la entrada de *T. cruzi* a la célula (Woolsey & Burleigh, 2004). De la misma manera, el egreso del parásito desde una célula infectada podría requerir la desestabilización del citoesqueleto celular; esta noción es reforzada por la observación de que en cultivos del parásito en células de mamífero mantenidas *in vitro*, las células infectadas cargadas de tripomastigotes pierden su forma y se redondean. Dado que los filamentos de

actina determinan la forma de la superficie de la célula (Alberts *et al.*, 2008), esta observación sugiere que los filamentos pueden verse afectados por los parásitos intracelulares, deformando la estructura general de la célula, Por esta razón, empleamos Citocalasina - D, un agente despolimerizante de actina (Shoji *et al.* 2012) para evaluar su impacto sobre el proceso de egreso celular.

3.8. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar los efectos causados en células infectadas por el protozoo *T. cruzi*, durante las fases finales de su ciclo intracelular; a partir de la realización de experimentos que nos permitan determinar cuan afectada se encuentra la célula durante la salida del parásito.

Objetivos Específicos

- Determinar el efecto que tienen los inhibidores de proteasas antipaína y fosforamidón en el egreso celular del parásito mediante ensayos colorimétricos.
- Caracterizar las alteraciones en el citoesqueleto y en la membrana plasmática de la célula hospedera durante los días 5, 6 y 7 post infección, mediante el uso de microscopía de fluorescencia.
- Caracterizar el impacto de agentes despolimerizantes de actina sobre el egreso celular de *T. cruzi* in vitro, mediante el uso de citocalasina – D en células infectadas.

- Evaluar la posible relación entre permeabilidad de la membrana plasmática de la célula hospedera y facilidad de egreso de *T. cruzi*, mediante el uso de medio de cultivo de células previamente infectadas y saponina.

3.9. JUSTIFICACIÓN

El proceso de invasión por parte de *T. cruzi* a la célula hospedera ha sido descrito por varios autores, no así la fase de egreso celular, la cual no ha sido estudiada a profundidad; en algunos estudios se sugiere que el egreso debe ser una manifestación mecánica, en la que después de 9 ciclos de división binaria del parásito, los tripomastigotes causarán la ruptura de la célula huésped (Andrade & Andrews, 2005), mientras que otros advierten que deben existir factores como proteasas o enzimas proteolíticas que lisan la célula al igual que lo que sucede con la vacuola parasitófora durante la infección (Costales & Rowland, 2007).

El estudio de este proceso, por lo tanto, permitirá aportar de manera sustancial en los conocimientos del ciclo de vida del parásito y por ende proporcionar una mayor comprensión de una etapa de suma importancia de la enfermedad, que es la fase intracelular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon células de mono LLC-MK₂, fibroblastos de ratón de la línea L929, fibroblastos humanos HFF y parásitos de la cepa Tulahuen, transformados genéticamente con el gen de la β -galactosidasa.

4.1. CÉLULAS Y PARÁSITOS - TRIPOMASTIGOTES

Células y parásitos fueron mantenidos en frascos de 75 cm² con tapa ventilada (Corning, Invitrogen) a 37 °C, 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa (HR) en una incubadora (Mettler).

Las células se mantuvieron en medio de cultivo celular modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS, Santa Cruz) y 1% de solución antibiótica con penicilina y estreptomycin (Cellgro) y 1% de piruvato de sodio (Sigma). Por su parte, las células infectadas con parásitos se mantuvieron en medio DMEM con 2% FBS y con la misma concentración de antibiótico y piruvato.

4.1.1. Mantenimiento de células

Las células fueron mantenidas semanalmente realizando divisiones 1:4 a partir de frascos de 75 cm² con capas celulares confluentes. Para ello, se lavó la capa de células dos veces con 10 mL de PBS 10 mM cada una, y se añadieron 2 mL de tripsina sin EDTA (Gibco, Life Technology). A continuación, se colocó el frasco en la incubadora durante 5 minutos,

pasado este tiempo se verificó microscópicamente el desprendimiento de las células, se tomaron 4 mL de DMEM 10% FBS para resuspenderlas e inactivar la tripsina.

Los 4 mL de medio más los 2 mL de tripsina con células sueltas dan un total de 6 mL que se distribuyeron en 2 nuevos frascos de 75 cm² conteniendo 8 mL de DMEM 10%. Se colocaron 2 mL de esta solución por cada frasco, para obtener un volumen final de 10 mL; los 2 mL restantes se pusieron en tubos cónicos con 10 mL de medio DMEM10% para obtener un total de 12 mL de solución, la misma que se distribuyó en placas de 6 pocillos (2 mL por pocillo, de células del tubo resuspendidas en DMEM 10%).

4.1.2. Propagación de tripomastigotes

Para el mantenimiento de los parásitos, se emplearon 3×10^6 tripomastigotes derivados de cultivo para infectar cada frasco de células LLC-MK₂. El medio de cultivo de frascos con células infectadas por al menos 5 días fue colectado en un tubo cónico de 15 mL (Corning) y se realizó un conteo de los tripomastigotes en un hemocitómetro (Fisher). Cada nuevo frasco fue infectado con 3×10^6 tripomastigotes parásitos.

4.2. PREPARACIÓN DE PLACAS DE EXPERIMENTACIÓN

Para la obtención de las células se procedió con la misma metodología de división mencionada anteriormente (dos lavados con PBS 10 mM y 2 mL de tripsina), a diferencia de que en este protocolo se realizó un conteo con el hemocitómetro para obtener $1,5 \times 10^4$ células por pocillo (para placas de 96 pocillos (Corning)) y 4×10^4 células por pocillo (para placas de 6 pocillos) para células de la línea LLC-MK₂. Previamente en la placa de 6 pocillos

se colocaron cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro y 0,16 mm de grosor (Fisher) que permitieron la adherencia de las células para tinciones inmunofluorescentes.

4.3. INFECCIÓN CELULAR EN PLACAS DE 6 Y 96 POCILLOS

Se colectaron parásitos en un tubo de 15 mL a partir de un frasco con células infectadas por al menos 5 días. Se los centrifugó, se realizó un lavado con 10 mL de PBS 10 mM y finalmente se contó los tripomastigotes en el hemocitómetro. Para la infección de placas de 96 pocillos se utilizaron $1,5 \times 10^6$ parásitos por pocillo, mientras que para la placa de 6 pocillos se colocaron 4×10^6 parásitos por pocillo, con la finalidad de infectar las placas a una proporción de 100 parásitos por célula (Anexo 4).

La liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) por parte de una célula indica que la integridad de la membrana plasmática se ha perdido. Por esta razón, en este estudio empleamos un ensayo colorimétrico para medir la liberación de LDH (Kit Cytotox 96 Non-Ratio Cytotoxicity Assay (Promega) con dos finalidades: Primero para evaluar citotoxicidad de los reactivos sobre las células en cultivo. Segundo, dado que el egreso del parásito requiere la destrucción de la membrana celular, medimos LDH en el medio como indicador de egreso. El ensayo empleado permite cuantificar las células permeables (i.e. muertas) midiendo la liberación de LDH, enzima presente en el citosol que escapa de las células muertas cuando estas pierden permeabilidad en la membrana plasmática. La LDH en el sobrenadante, proveniente de células perforadas o muertas, reacciona con la sal de tetrazolio que es parte del sustrato del kit y forman un producto de formazán rojo.

4.4. CUANTIFICACIÓN DE FORMAZÁN

El producto de formazán se cuantificó mediante lecturas de espectrofotometría a 490 nm usando un lector de ELISA (ELX 800, Bio Tek Instruments). El porcentaje de muerte celular en cada tratamiento se calculó a partir de los valores de absorbancia obtenidos de la lisis total, la misma que se logra colocando 10 μ L de la “solución de lisis” del kit durante 45 minutos en pocillos de células de control y causa el 100% de muerte y a su vez la mayor cantidad de liberación de LDH en el medio.

Después de colocada la solución de lisis por 45 minutos, se centrifugó el sobrenadante de cada pocillo a 250 x g por 4 minutos, se añadieron 50 μ L de sustrato en todos los pocillos a analizar durante 30 minutos, finalmente se pusieron 50 μ L de “solución stop” para parar la reacción y se leyó la placa a 490 nm. Se incluyeron además blancos (sustrato del kit), y las absorbancias de los mismos fueron substraídos de las absorbancias obtenidas.

4.5. TINCIONES DE FLUORESCENCIA

Se colocaron cubreobjetos circulares en las placas de 6 pocillos empleando técnica estéril. Sobre estos cubreobjetos se hicieron crecer células y se realizaron infecciones con tripomastigotes como se indica en el punto 4.3.

La infección se permitió progresar por 5, 6 y 7 días, y las células fueron fijadas con paraformaldehído (HLMedia) al 4% en PBS 30 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se removió el paraformaldehído y se colocaron 2 mL de NH_4Cl disuelto en PBS 10 mM durante 15 minutos. Posteriormente se desechó el NH_4Cl y se colocaron 2 mL de 1% de albúmina de suero bovino (Santa Cruz) en TBS (TBS/BSA) durante 10

minutos. Seguido de esto, las células fueron permeabilizadas con TBS/BSA y 1% de saponina (Santa Cruz) durante 20 minutos.

Para la tinción de los parásitos, se colocaron los cubreobjetos, por 40 minutos, en 70 μ L del anticuerpo primario de conejo anti *T. cruzi* (Aislado CIEI) diluido 1:1000 en TBS/BSA e inmediatamente se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno en TBS/BSA/SAP. Subsiguientemente, se incubó con el anticuerpo secundario bovino anti conejo IgG, marcado con el fluorocromo CFI 488 (Santa Cruz) diluido en TBS/BSA a 1:1500 por 40 minutos. Al igual que con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS/BSA/SAP.

Para la tinción de los filamentos de actina, se colocaron 50 μ L de Faloidina marcada con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (Santa Cruz) color rojo, diluido en TBS/BSA 1:10000 por 20 minutos y para terminar se realizaron 4 lavados con PBS 10 mM, de 5 minutos cada uno.

Finalmente, para la tinción de los núcleos de las células, los kinetoplastos y núcleos de los parásitos, 6 μ L de ProLong Gold Antifade Reagent con 4', 6'- diamidino - 2 - fenilindol (DAPI) (Invitrogen) se colocaron y los cubreobjetos en portaobjetos de cristal se montaron.

4.6. OBSERVACIÓN DE LOS CUBREOBJETOS EN EL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Después de realizadas las tinciones, los cubreobjetos se secaron durante 24 horas protegidos de la luz; y las placas se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus modelo BX51), equipado con los siguientes filtros: DAPI (para fluorocromo azul), Texas Red (para fluorocromo rojo) y FITC (para fluorocromo verde).

4.7. ESTANDARIZACIÓN DEL KIT CELLTITER PARA MEDIR ABSORBANCIA CUANTIFICAR TRIPOMASTIGOTES

En una placa de 96 pocillos se colocaron 11 diferentes diluciones seriadas 1:2 entre 1×10^6 y $1,95 \times 10^3$ parásitos. Se incluyeron además, dos pocillos de blanco (Anexo 5). Se colocaron 20 uL del kit CellTiter y finalmente se realizaron lecturas de absorbancia a 490 nm; con la finalidad de determinar el rango óptimo de cantidad de parásitos para el uso del kit.

4.8. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LA CITOCALASINA D EN TRIPOMASTIGOTES DE *T. cruzi*

Para verificar que la citocalasina D no tiene efectos tóxicos sobre el parásito a las concentraciones empleadas en los ensayos (lo que sería un factor de confusión en los ensayos), se midió la toxicidad de este reactivo sobre tripomastigotes. Para ello se prepararon tubos de 1,5 mL con diluciones seriales del reactivo (1:1 – 2 μ M, 1:2 – 1 μ M, 1:4 – 0,5 μ M). Se colocaron posteriormente 100 μ L de cada solución en los pocillos designados según el

mapa (Anexo 6). Los tripomastigotes fueron expuestos al reactivo por 24, 48 y 72 horas y la muerte celular se cuantificó utilizando el Kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega).

4.9. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS ANTIPAÍNA Y FOSFORAMIDÓN EN CÉLULAS LLc-MK₂

Se emplearon inhibidores de proteasas de Santa Cruz Biotechnology. En placas de 96 pocillos se colocaron 2×10^4 células por pocillo en medio DMEM 10% FBS, y se les permitió adherirse y crecer por 48 horas. Las células se trataron con diluciones seriales de antipaína (400 μ M – 100 μ M) o fosforamidón (40 μ M – 10 μ M Santa Cruz). Se realizaron lecturas colorimétricas a las 24, 48 y 72 horas de colocados los inhibidores, utilizando el Kit Cytotox (Anexo 7).

4.10. EXPERIMENTO DE EGRESO CELULAR DEL PARÁSITO EN PLACAS TRATADAS CON LOS REACTIVOS ANTIPAÍNA, FOSFORAMIDÓN Y CITOCALASINA – D

Se prepararon placas de 96 pocillos como se indica en el punto 4.2 y se infectaron las dos primeras filas siguiendo el protocolo del punto 4.3; las cuatro filas subsiguientes se utilizaron para células no infectadas y blancos.

La fila B de la placa se usó para células infectadas control, en la fila C se colocó el tratamiento – ya sea antipaína, fosforamidón o citocalasina –, en la fila D se colocó el mismo tratamiento de la fila superior para determinar si este afecta o no a células no infectadas (se

restó este control en los pocillos tratamiento), la fila E permitió obtener el valor en porcentaje de mortalidad, el control positivo de la placa (fila F) se usó para calcular la lisis total celular o 100% de liberación de LDH y finalmente la fila G fue únicamente destinada para blancos (solo DMEM2% FBS) (Anexo 8).

Se colocaron los reactivos a las 96 horas post infección. Se usó fosforamidón a una concentración de 10 μ M, antipaína a 100 μ M y citocalasina a 2 μ M (tomando en cuenta las concentraciones óptimas descritas por la casa comercial (Sigma).

Además, para eliminar el error típico de absorbancia en todos los experimentos. Se restó el valor de la absorbancia de la muerte celular natural, la toxicidad causada por el inhibidor y el blanco.

4.11. PERMEABILIDAD DE CÉLULAS INFECTADAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SAPONINA

En placas de 96 pocillos, se sembraron células LLc-MK₂, como se describe en el punto 4.2 y se las infectó con tripomastigotes siguiendo los pasos del punto 4.3. Se realizaron 9 diluciones seriadas en medio de cultivo (DMEM 2% FBS) en tubos de 1,5 mL, a partir de una solución inicial de saponina al 0,05% (peso: volumen) (Anexo 9) y se colocaron 100 μ L de cada concentración a dos pocillos con células infectadas y dos pocillos con células no infectadas (Anexo 10).

Después de colocadas las soluciones, las células fueron expuestas a las soluciones de saponina durante 20 minutos; pasado este tiempo se desechó el medio y se colocaron 100

μ L de Trypan Blue (0,4% en PBS 10 mM) por 10 minutos, se prosiguió haciendo un lavado de los pocillos con PBS 10 mM. Finalmente, los pocillos se fotografiaron, las células fueron contadas y se calculó el porcentaje de células permeables (teñidas en azul) en relación al total de células.

4.12. PERMEABILIDAD DE CÉLULAS INFECTADAS TRATADAS CON MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS INFECTADAS Y CÉLULAS NO INFECTADAS

Se prepararon placas de 96 pocillos con células LLc-MK₂ infectadas y de control, siguiendo los pasos del punto 4.3. Las células fueron expuestas con dos tipos de medio de cultivo – DMEM de células infectadas y DMEM tomado de medio de células no infectadas – ambos se extrajeron por separado a partir de frascos de mantenimiento durante 1 semana en tubos cónicos de 50 mL. Posteriormente, se colocaron 100 μ L de cada medio de cultivo en el día 4 post infección durante 24 horas (Anexo 11), pasado este lapso se desechó el medio de cultivo y se adicionaron 100 μ L de Trypan Blue por 10 minutos. A continuación, los pocillos fueron lavados con PBS 10 mM y las células fueron fotografiadas con el lente objetivo de 20X para realizar conteos de las células permeables (teñidas en azul).

4.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Con el programa SPSS versión 22.0, se realizaron pruebas de análisis de varianza (por sus siglas en inglés ANOVA); además de la prueba Tukey que muestra significación de los tratamientos y tiempo reflejada en grupos.

5. RESULTADOS

5.1. TINCIONES DE FLUORESCENCIA

Las tinciones de fluorescencia permitieron observar las alteraciones morfológicas causadas por los parásitos intracelulares en la célula hospedera durante los días 5, 6 y 7 post infección (Figuras 2 y 3), como los microfilamentos de actina que en células infectadas se despolimerizaron o se encontraron muy afectados (Figura 4); mientras que en células no infectadas estos se distribuyen homogéneamente en el citosol (Figura 5).

En las fases finales de la infección, las células de ratón L929 presenta cambios notables en su morfología, al perder su adherencia al sustrato adquiriendo una forma redondeada (Figura 4).

5.2. ESTANDARIZACIÓN DEL KIT CELLTITER PARA MEDIR ABSORBANCIA DE TRIPOMASTIGOTES

Con el fin de validar el uso del kit para cuantificar parásitos viables se realizó una curva de calibración y se determinó que el rango lineal del kit fue de $1 \times 10^6 - 6,25 \times 10^4$ parásitos por pocillo, es decir que en ese rango de tripomastigotes los 20 μL del CellTiter reaccionan de forma eficiente (Figura 6).

5.3. TOXICIDAD DE LA CITOCALASINA EN TRIPOMASTIGOTES

A medida que aumenta el tiempo de exposición de los parásitos a la citocalasina, se pudo observar que la absorbancia disminuyó y por ende la viabilidad de los parásitos decreció, tomando en cuenta que el kit CellTiter determina viabilidad celular. También se pudo determinar que las concentraciones del reactivo no influyen directamente en la viabilidad de los tripomastigotes (Figura 7).

5.4. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS EN CÉLULAS LLC-MK₂

Después de realizados los experimentos de toxicidad con la antipaína y el fosforamidón, se observó que la toxicidad producida por la antipaína no es significativa a las 24 horas de colocado el tratamiento y por lo mismo no se realizó pruebas Post Hoc en este tiempo (Tabla 1); los ANOVA a las 48 y 72 horas post tratamiento son altamente significativos para los tratamientos ($p < 0,01$) (Tablas 2 y 3) y las pruebas Tukey se forman dos grupos uno que contiene a las célula con las diferentes concentraciones y otro de las células control, lo que indica que la significancia está dada entre ambos grupos más no entre tratamientos (Tablas 4 y 5). Mientras que para el fosforamidón las pruebas de ANOVA no mostraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos en ninguno de los tiempos (Tablas 6, 7 y 8) y no se realizó pruebas estadísticas Post Hoc porque no se obtuvieron diferencias. Por esta razón, para ambos inhibidores se emplearon las concentraciones más bajas en los experimentos subsiguientes de egreso celular, 100 μM para la antipaína y 10 μM para el fosforamidón.

5.5. DESPOLIMERIZACIÓN DE LA ACTINA Y EGRESO CELULAR DEL PARÁSITO

El aumento en los niveles de LDH liberados por las células permitió dilucidar que probablemente hubo una despolimerización de los filamentos de actina potenciado por la citocalasina (Figura 10); ya que los resultados estadísticos de ANOVA son altamente significativos con respecto a los tratamientos para los días 5, 6 y 7 ($p < 0,01$) (Tablas 9, 10 y 11) (Anexo 13). Los análisis de Tukey por su parte muestran que el reactivo funciona de forma eficiente durante los días 5 y 6 post infección ya que muestran a las células infectadas control y las células infectadas con el tratamiento en grupos separados (Tablas 12 y 13); sin embargo para el día 7 post infección la diferencia encontrada fue entre células infectadas y no infectadas, más no entre las células infectadas control y la infectadas con el tratamiento (Tabla 14); de igual manera la mayor diferencia observada entre las células infectadas con y sin el tratamiento son en los días 5 y 6 (23 y 16% respectivamente) lo que indica que el efecto del agente depolimerizante tiene efecto en estos dos días (Tabla 15). Esto sugiere que un mayor número de parásitos fue liberado por las células al depolimerizarse el citoesqueleto de actina por efecto de la citocalasina (Figura 10).

5.6. EXPERIMENTO DE EGRESO CELULAR DEL PARÁSITO EN PLACAS TRATADAS CON LOS REACTIVOS ANTIPAÍNA, FOSFORAMIDÓN

El egreso del parásito implica ruptura de la membrana celular; por esta razón, medimos la liberación de LDH en el medio de cultivo como indicador egreso. Se encontró una reducción altamente significativa ($p < 0,01$) de la liberación de LDH (Anexo 12) para la antipaína y esto se sustentó además con los análisis de ANOVA durante los días 5, 6 y 7 post infección (Tablas 16, 17 y 18); sin embargo la significación entre las células infectadas

control y las células infectadas con los tratamientos, fue marcada en los días 6 y 7 ya que en los análisis de Tukey en el día 5 todos los tratamientos se agruparon en un solo conjunto (Figura 11, Tablas 19, 20 y 21). Además el día 6 post infección, en células tratadas con antipaína, es el que mostró una mayor acción del reactivo pues presentó la diferencia más alta en el porcentaje de toxicidad con un 28% a diferencia de los días 5 (6% de toxicidad) y 7 (14% de toxicidad) (Tabla 22).

Las tablas de ANOVA para el fosforamidón al igual que la antipaína muestran diferencias altamente significativas con respecto a los tratamientos en los días 5, 6 y 7 post infección ($p < 0,01$) (Figura 12) (Tablas 23, 24 y 25). Los análisis de Tukey mostraron que los datos son diferentes entre las células infectadas control y las células infectadas con el tratamiento únicamente para el día 6 post infección (Tabla 27), en los días 5 y 7 ambas variables se encuentran en el mismo conjunto lo que muestra que no tienen diferencias entre ellas (Tabla 26 y 28). A pesar de que la diferencia de porcentaje más alta se encuentra en el día 7 post infección (28%), los análisis Post Hoc sustentan que el día de óptima acción del fosforamidón en inhibir el egreso, es el día 6 con un 18% de toxicidad (Tabla 29).

El día 6 post infección para ambos reactivos fue el que presentó la variación más notable, la diferencia entre las células infectadas con el tratamiento y las células infectadas control fue mayor en comparación al día 5 y 7 (Tablas 22 y 29).

5.7. EFECTO DE LA PERMEABILIDAD EXPERIMENTAL DE CÉLULAS INFECTADAS SOBRE EL EGRESO CELULAR

Dado que las células se permeabilizan y la integridad de la membrana plasmática se pierde antes y durante la fase de egreso (Costales & Rowland, 2007), se investigó si las membranas plasmáticas de las células infectadas presentan una mayor fragilidad que las células no infectadas. Para ello, expusimos células infectadas y no infectadas a un tratamiento con detergentes (saponina $5 \times 10^{-2}\%$, - $9,77 \times 10^{-5}\%$). La permeabilización de las células se evidenció mediante tratamiento con Trypan-blue, que tiñe selectivamente las células con membranas permeables. A las concentraciones más altas ($5 \times 10^{-2}\%$) el 100% de las células era permeable (teñidas de azul), mientras que a las concentraciones más bajas, prácticamente ninguna de las células se permeabilizó (Figura 13). Sin embargo, no existieron diferencias marcadas para el nivel de permeabilización entre células infectadas y no infectadas.

5.8. PERMEABILIDAD DE CÉLULAS INFECTADAS TRATADAS CON MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS INFECTADAS Y CÉLULAS NO INFECTADAS

Durante la invasión celular, el parásito emplea la proteína conocida como Tc-Tox para formar poros en la membrana de la vacuola parasitófora y egresar de ella y así lograr establecerse en el citoplasma de la célula hospedera (Palau, 2000). De manera análoga, el parásito podría emplear proteínas formadoras de poros que debiliten la membrana plasmática durante el egreso celular. Si existiesen proteínas formadoras de poros asociados al proceso de egreso celular, es posible que estas se acumulen en el medio de cultivo que baña a las células infectadas que se encuentran liberando parásitos. Es por esta razón que tratamos las células con este tipo de medio, así como con medio de células no infectadas como control.

Las células infectadas como es de esperar producen mayor permeabilidad que las no infectadas, y es por esta razón que las pruebas de Tukey formaron dos conjuntos que agrupan a las dos variables (infectadas y no infectadas) (Tabla 31). Además se esperaba que ambos medios de cultivo produzcan diferente porcentaje de permeabilidad, sin embargo no se observaron diferencias significativas para ambos tratamientos (Tabla 30). El porcentaje general de permeabilidad no supera el 4%, sustentando el hecho de que no existen diferencias entre los tratamientos (Figura 14).

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una parte esencial del ciclo de vida de los patógenos intracelulares es el egreso de la célula hospedera, el mismo que permite a los parásitos infectar nuevas células dentro del mismo o nuevos hospederos. En el caso de *T. cruzi*, la infección intracelular ocurre únicamente en el hospedero mamífero (Rassi & Marin-Neto, 2010). El egreso de las células infectadas produce una progenie de tripomastigotes que pasan a la circulación sanguínea, desde donde infectan nuevos tejidos, diseminándose del punto de infección inicial e infectan nuevos vectores.

El proceso de egreso celular de *T. cruzi* no ha sido estudiado a profundidad en el pasado, y son prácticamente desconocidos los mecanismos que permiten la salida de los tripomastigotes desde las células de mamífero en las que el parásito se multiplicó. Estudios previos (Costales & Rowland, 2007) han implicado a proteasas y descrito la permeabilidad que caracteriza a las células en las fases tardías de infección con *T. cruzi*. En los días cuatro a cinco post infección, las células de mamífero cultivadas *in vitro* pierden su forma además de adherencia al sustrato, redondeándose y a veces desprendiéndose. Además, en esta fase del ciclo celular, los parásitos, tripomastigotes intracelulares, son bastante móviles y activos dentro de la célula. Debido a que el citoesqueleto, sobretodo los microfilamentos de actina están involucrados en mantener la forma de las células (Hayakawa *et al.*, 2011), se decidió explorar el efecto que la infección con *T. cruzi* tiene sobre estas estructuras. Tomando en cuenta que el proceso de egreso ocurre a partir de los días 4 o 5 post infección, se buscaron alteraciones en el citoesqueleto. Para evidenciar las alteraciones provocadas por el parásito en las fibras de actina de las células hospederas, se realizaron tinciones del citoesqueleto de actina con el uso de faloidina marcada con fluorocromos. Los resultados sugieren que existe

una despolimerización de las fibras de actina alrededor del núcleo de la célula, mientras que la tinción se mantuvo claramente en el área submembranal. Esta despolimerización provoca que la célula se redondee y pierda su forma inicial, sin embargo se desconocen los mecanismos por los cuales los filamentos de actina son despolimerizados.

Se concluye también que las células infectadas con *T. cruzi* presentan alteraciones a nivel de los microfilamentos de actina cerca del núcleo provocándose la deformación de la mismas (células redondeadas), mientras que submembranalmente estos se encuentran estables; probablemente esto pueda deberse a que los parásitos no necesitan de una célula que mantenga su forma estable, sino simplemente un reservorio que los mantenga hasta poder replicarse y posteriormente cumplir con su función biológica de infectar nuevas células vecinas o nuevos hospederos mamíferos.

Es probable que el parásito induzca la despolimerización de actina, afectando el citoesqueleto, en las etapas finales del ciclo intracelular. Y es de suma importancia ampliar el conocimiento a nivel proteico de *T. cruzi* para poder dilucidar el tipo de enzimas que usa el parásito intracelularmente y sobre todo en la etapa de salida.

Adicionalmente, se probó la capacidad de acelerar la salida del parásito mediante el uso de la citocalasina-D. En presencia del reactivo, las células infectadas con *T. cruzi* presentaron una mayor permeabilidad de membrana (una característica del egreso del parásito), los resultados sugieren que al despolimerizarse el citoesqueleto, un mayor número de parásitos egresa de las células infectadas. Además, sugieren que el citoesqueleto constituye una barrera física para el egreso, esto a su vez sugiere que los factores líticos liberados en el medio de cultivo actúan específicamente sobre las células infectadas a

diferencia del detergente que permeabiliza ambos tipos de células por igual. Las membranas plasmáticas de las células infectadas no serían, aparentemente, más frágiles que las de las no infectadas. Pero sí son más susceptibles a la acción de los factores líticos liberados durante el egreso.

La acción de la citocalasina se da con mayor eficiencia en los días 5 y 6 post infección a diferencia de los inhibidores de proteasa que actúan solo en el día 6; por lo tanto es probable que estadísticamente la acción de las proteasas y los agentes depolimerizantes usados por *T. cruzi* estén más activos para el proceso de egreso celular durante el día 6 post infección.

Además de la motilidad del parásito durante la fase de egreso, es de esperarse que la actividad de enzimas líticas como proteasas y lipasas faciliten la degradación de estructuras de la célula hospedera (Faucheu *et al.*, 1995) que puedan actuar como barreras en la salida del parásito. Trabajos anteriores (Aguinaga, 2013; Costales & Rowland, 2007) han indicado previamente que las proteasas pueden jugar un rol importante en este proceso; es bien conocido que el parásito produce una gran variedad y cantidad de estas enzimas, entre ellas la proteasa de cisteína cruzipaína (Alvarez *et al.*, 2012; Berasain *et al.*, 2003) y también metaloproteasas como la MMP-2 o la MMP – 9 (Gutierrez *et al.*, 2008). Por este motivo, tratamos células infectadas por el parásito a las 96 horas post infección con antipaína (inhibidor de proteasas de cisteína) y fosforamidón (inhibidor de metaloproteasas). Además, es muy importante mencionar que los inhibidores fueron colocados a las 96 horas para minimizar el bloqueo de transformación de amastigotes a tripomastigotes y viceversa (Klemba & Goldberg, 2002) lo cual puede influir en el proceso de egreso y a su vez afectar la observación de los resultados finales. Con respecto al tiempo en el que actúan ambos inhibidores, se pudo concluir que para el día 6 post infección son significativamente más

efectivos. Las diferencias entre las células infectadas control y las células infectadas con fosforamidón mostraron que el mayor porcentaje estaba dado en el día 7 (Tabla 29), sin embargo la desviación estándar anula este resultado y es por esta razón que la tabla 28 de Tukey es más confiable y demuestra que no hay diferencias entre ambas variables y las agrupa en el mismo conjunto.

Trabajos anteriores (Aguinaga, 2013) han demostrado que las concentraciones de los reactivos utilizados no eran tóxicos para los parásitos. Aun así, adicionalmente incluimos controles de células no infectadas más el tratamiento y se usaron las concentraciones más bajas y recomendadas por la casa comercial de los reactivos (100 μ M para la Antipaína y 10 μ M para el fosforamidón); este control nos permitió determinar que a pesar de que el fosforamidón causa reducción del porcentaje de toxicidad en las células infectadas, también es nocivo para las no infectadas (Tablas 26 y 27) y es probable que se reduzca o elimine su acción durante el egreso y no sea significativo en esta fase del ciclo intracelular del parásito (Figura 14). En cuanto a la antipaína durante el día 6 post infección no se observó que el reactivo sea toxico en las células no infectadas (Tabla 20), por lo tanto se puede decir que este inhibidor es mucho más efectivo que el fosforamidón; confirmando el rol de las proteasas de cisteína en la salida del parásito durante este tiempo.

La membrana plasmática constituye la barrera final que debe atravesar el parásito para egresar. Durante la invasión celular, el agente infeccioso debe escapar de la membrana parasitófora para establecerse en el citoplasma, en dicha fase de su ciclo intracelular, *T. cruzi* hace uso de una proteína formadora de poros llamada Tc-TOX, la misma que induce la lisis de la vacuola (Hall *et al.*, 1992). Si es que proteínas análogas u otras proteínas líticas como lipasas o proteinasas facilitan la lisis de la membrana plasmática durante el egreso celular de

T. cruzi, sería de esperar que estas proteínas se encuentren en el medio sobrenadante de cultivos de células infectadas. Por ello, emplear dicho sobrenadante para tratar cultivos con células a punto de liberar parásitos, podría inducir un aumento del número de células permeables, mientras que se esperaría que el medio de células no infectadas no produzca este efecto. Los resultados observados para estos análisis, no presentaron datos concluyentes puesto que el porcentaje de células permeables observadas es no significativo con respecto a los diferentes tratamientos realizados, la concentración de proteínas en medio de cultivo de células infectadas debería ser mayor al de células no infectadas por esta razón este medio potenciará el proceso de egreso celular.

Adicionalmente, se decidió evaluar si es que la permeabilización experimental de las células hospederas mediante la adición de un detergente facilita el egreso; para este fin se usó saponina, pues tiene la capacidad de permeabilizar la membrana (Arabski *et al.*, 2012). Se trató células infectadas y no infectadas con el detergente en un amplio rango de concentraciones, sin que las células infectadas se volvieran permeables con mayor facilidad que las no infectadas. Esto sugiere que los factores líticos liberados en el medio de cultivo podrían actuar específicamente sobre las células infectadas, a diferencia del detergente que permeabiliza ambos tipos de células por igual. Las membranas plasmáticas de las células infectadas no serían, aparentemente, más frágiles que las de las células no infectadas, en principio. Pero sí son más susceptibles a la acción de factores líticos liberados durante el egreso.

A partir de nuestros resultados se determinó que efectivamente las metaloproteasas y las proteasas de cisteína cumplen un rol fundamental en el proceso de egreso celular de *T. cruzi*, estas enzimas ayudan al parásito a culminar su ciclo intracelular promoviendo la salida de

los tripomastigotes; se pudo llegar a confirmar esta hipótesis ya que la inhibición de dichas proteasas limita el proceso de egreso. Las proteasas tienen la función de hidrolizar los enlaces peptídicos del citoesqueleto y las proteínas inter-membrana; por esta razón el uso de las mismas es probable que sea trascendental en el egreso de *T. cruzi*. La degradación de estos enlaces permitiría que los parásitos atravesasen con mayor facilidad la membrana plasmática, para que puedan continuar con su ciclo de vida (Engel *et al.*, 1998).

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer más experimentos con medio de cultivo de células infectadas y no infectadas, utilizando protocolos específicos para concentración de proteínas del medio. De esta manera, es probable que se logre mostrar más claramente el efecto de proteínas líticas, si es que estas están en efecto presentes en el medio de cultivo.

De igual forma en los experimentos en los que se utilizó sobrenadante de medio de cultivo, se recomienda que para calcular el número de células permeables (teñidas con Trypan blue), se utilice un programa de conteo celular para reducir el error de células encontradas por campo.

La cruzipaina es una de las mayores proteasas de cisteínas presentes en *T. cruzi*, los inhibidores de esta encima han logrado reducir la toxicidad del parásito y es probable que también esté involucrada en el proceso de egreso celular. Por lo tanto, se recomienda utilizar inhibidores específicos para la cruzipaina en las etapas finales del ciclo intracelular, para ampliar el conocimiento en las funciones de esta enzima durante el proceso de egreso celular.

8. LITERATURA CITADA

- Aguinaga, R. (2013). *Caracterización del proceso de egreso celular del protozoario parásito Trypanosoma cruzi*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (Fifth Edit, p. 1725). New York: Garland Science. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T., & Cazzulo, J. J. (2012). The peptidases of Trypanosoma cruzi: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 195–206. doi:10.1016/j.bbapap.2011.05.011
- Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2005). The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(10), 819–23. doi:10.1038/nrmicro1249
- Arabski, M., Węgierek-Ciuk, A., Czerwonka, G., Lankoff, A., & Kaca, W. (2012). Effects of Saponins against Clinical *E. coli* Strains and Eukaryotic Cell Line. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–6. doi:10.1155/2012/286216
- Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Cazzulo, J. J., & Goñi, F. (2003). Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130, 23–29. doi:10.1016/S0166-6851(03)00139-7

- Brusca, R., & Brusca, G. (2005). *Invertebrados* (Segunda Ed, pp. 143–146). México: McGraw Hill Interamericana.
- Burleigh, B. A., & Woolsey, A. M. (2002). Microreview Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology*, 4(11), 701–711.
- CDC. (2015). *Chagas Disease: Life cycle of Trypanosoma cruzi*.
- Chapman, H. a, Riese, R. J., & Shi, G. P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual Review of Physiology*, 59, 63–88. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.63
- Costales, J., & Rowland, E. C. (2007). A role for protease activity and host-cell permeability during the process of *Trypanosoma cruzi* egress from infected cells. *The Journal of Parasitology*, 93(6), 1350–9. doi:10.1645/GE-1074.1
- Engel, J. C., Doyle, P. S., Hsieh, I., & McKerrow, J. H. (1998). Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 188(4), 725–734.
- Esper, L., Brant, F., Weiss, L. M., Tanowitz, B., & Machado, F. (2014). *Trypanosomiasis and Cardiac Disease*. (E. M. Da Cruz, D. Ivy, & J. Jagers, Eds.) (pp. 2407–2419). London: Springer London. doi:10.1007/978-1-4471-4619-3
- Faucheu, C., Diu, a, Chan, A., Blanchet, A., Miossec, C., Hervé, F., ... Herve, F. (1995). A novel human protease similar to the interleukin-1 beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO Journal*, 14(9), 1914–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=C>

itation&list_uids=7743998\http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=398290&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

- Friedrich, N., Hagedorn, M., Soldati-favre, D., & Soldati, T. (2012). Prison Break : Pathogens ' Strategies To Egress from Host Cells, 76(4), 707–720. doi:10.1128/MMBR.00024-12
- Gutierrez, F. R. S., Lalu, M. M., Mariano, F. S., Milanezi, C. M., Cena, J., Gerlach, R. F., ... Silva, J. S. (2008). Increased Activities of Cardiac Matrix Metalloproteinases Matrix Metalloproteinase (MMP)–2 and MMP-9 Are Associated with Mortality during the Acute Phase of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 197, 1468–1476. doi:10.1086/587487
- Hall, B. F., Webster, P., Ma, a K., Joiner, K. a, & Andrews, N. W. (1992). Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(August), 313–325. doi:10.1084/jem.176.2.313
- Hayakawa, K., Tatsumi, H., & Sokabe, M. (2011). Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *Journal of Cell Biology*, 195(5), 721–727. doi:10.1083/jcb.201102039
- Klemba, M., & Goldberg, D. E. (2002). BIOLOGICAL ROLES OF PROTEASES IN PARASITIC PROTOZOA. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 275–305. doi:10.1146/annurev.biochem.71.090501.145453

- McKerrow, J., Rosenthal, P., Swenerton, R., & Doyle, P. (2013). Development of protease inhibitors for protozoan infections. *NIH Public Access*, 18(6), 1199–1216. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate
- Mott G. & Burleigh B. (2009). Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Physiology*, 218(2), 315–322. doi:10.1002/jcp.21606.Modulation
- OPS. (2015). *Reporte sobre la enfermedad de Chagas*.
- Palau, T. (2000). Relación hospedero-parásito *Trypanosoma cruzi*. *MZV-CORDOBA*, 5(1), 33–37.
- Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26, 275–291. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002
- Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388–402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- Shoji, K., Ohashi, K., Sampei, K., Oikawa, M., & Mizuno, K. (2012). Biochemical and Biophysical Research Communications Cytochalasin D acts as an inhibitor of the actin – cofilin interaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(1), 52–57. doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.063
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5-6), 472–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334932>

Woolsey, A. M., & Burleigh, B. a. (2004). Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cellular Microbiology*, 6(9), 829–38. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00405.x

Yumiseva, C. (2014). *Modelamiento predictivo de distribución de Rhodnius ecuadoriensis. Vector principal de la Enfermedad de Chagas en Ecuador*. Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

9. FIGURAS

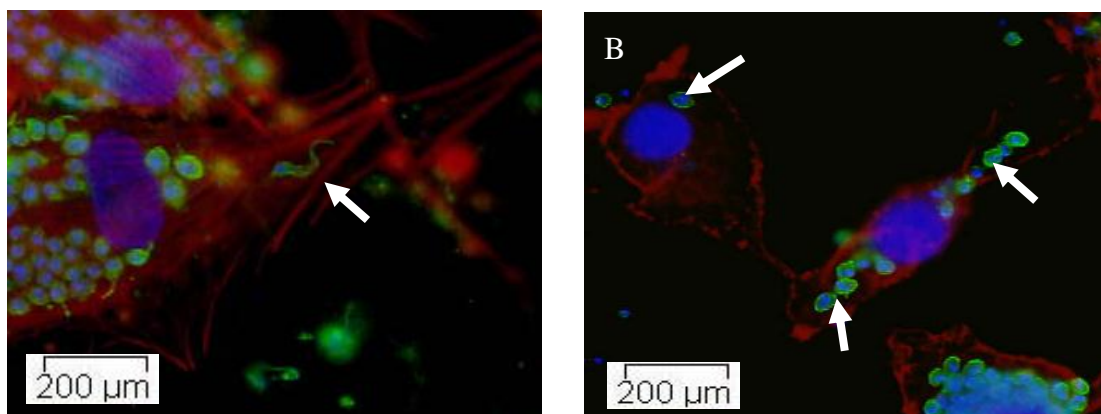


Figura 1. Parásitos de *T. cruzi* infectando fibroblastos L929. A) Tripomastigote. Micrografía de fluorescencia de un parásito en estadio de tripomastigote (flecha). **B) Amastigotes.** Micrografía de fluorescencia de un amastigote, forma replicativa intracelular. Los parásitos fueron marcados con anticuerpo primario de conejo contra *T. cruzi* (1:1000 en TBS/BSA) y anticuerpo secundario bovino contra IgG de conejo marcado con Cruz Fluor (CFI) 488 (1:1500 en TBS/BSA) (verde). Kinetoplastos y núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y finalmente, los filamentos de actina – faloidina 458 (1:10000 en TBS/BSA) (rojo).

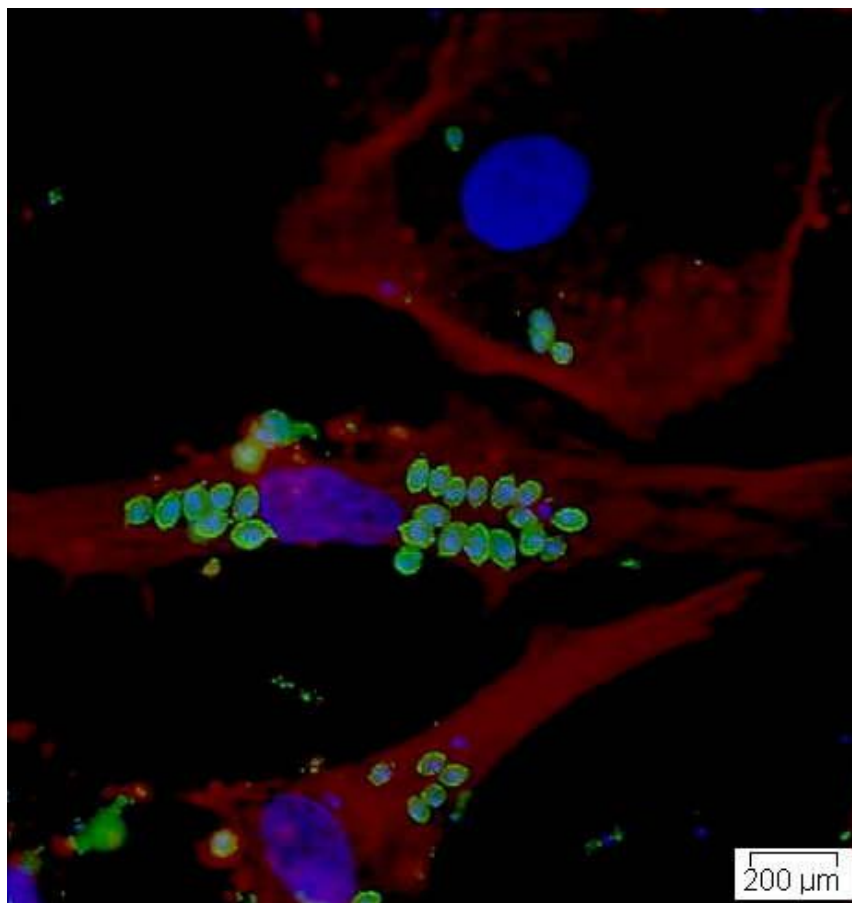


Figura 2. Fibroblastos L929 infectados con *T. cruzi*, día 5 post infección. 100x de fluorocromos: DAPI – ácidos nucleicos (azul), faloidina 548– microfilamentos de actina (1:10000 en TBS/BSA) (rojo) y finalmente para los parásitos – anticuerpo primario de conejo anti *T. cruzi* (1:1000 en TBS/BSA) y anticuerpo secundario bovino anti conejo marcado con CFI 488 (verde) (1:1500 en TBS/BSA).

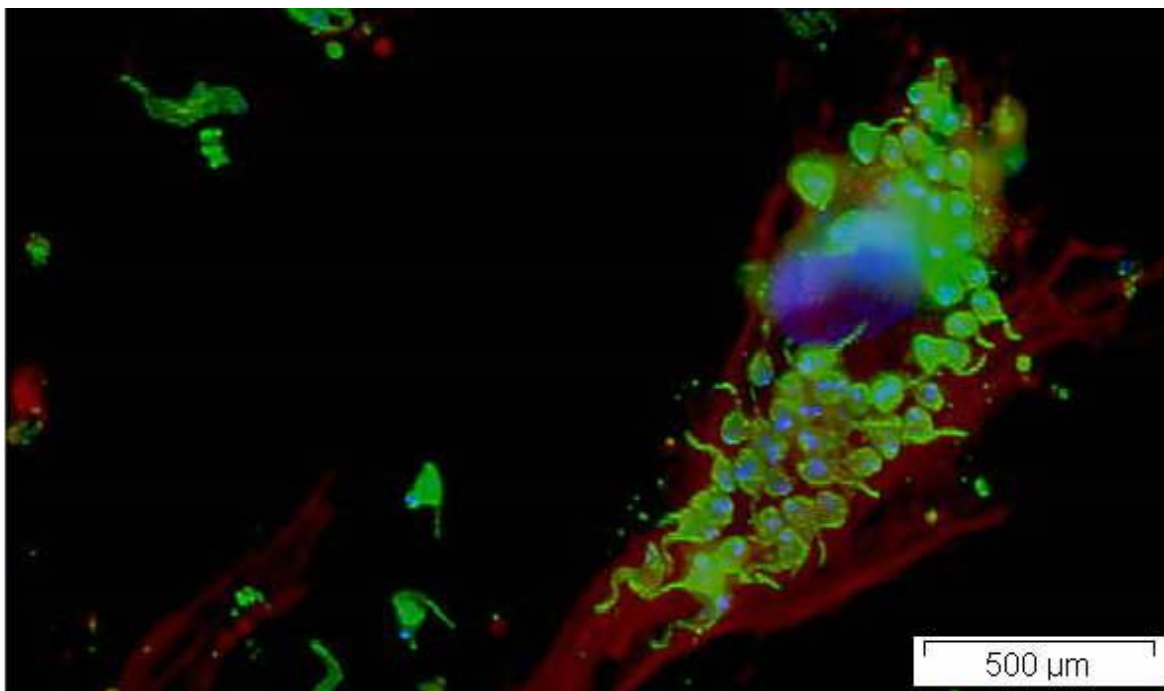


Figura 3. Fibroblastos L929 infectados con *T. cruzi*, en día 7 post infección. 100x
Fluorocromos: DAPI – ácidos nucleicos, faloidina 548– microfilamentos de actina (1:10000 en TBS/BSA) y finalmente para los parásitos – anticuerpo primario de conejo anti *T. cruzi* (1:1000 en TBS/BSA) y anticuerpo secundario bovino anti conejo marcado con CFI 488 verde (1:1500 en TBS/BSA).

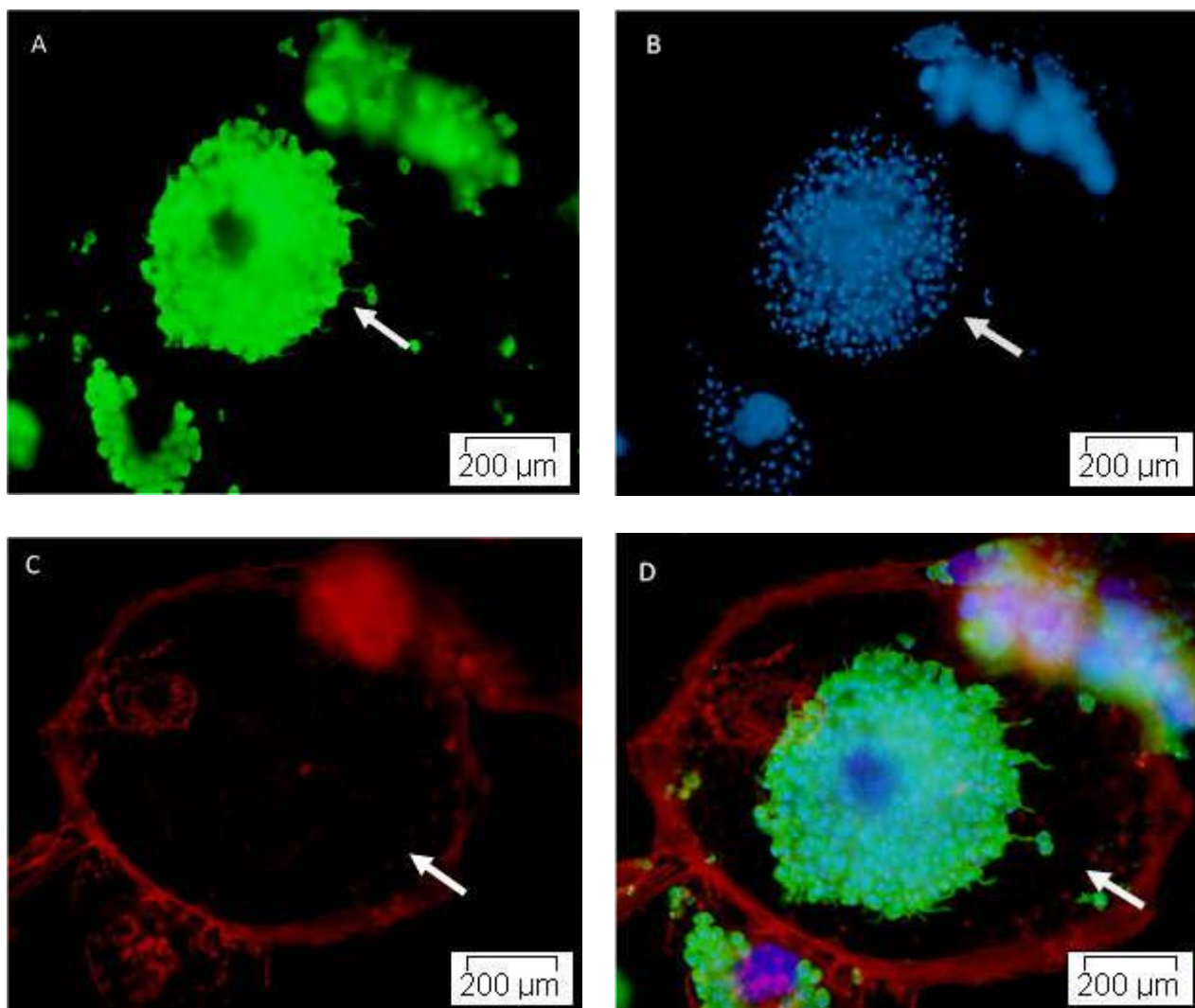


Figura 4. Filamentos de actina en fibroblastos L929 infectados. Tinción con fluorocromos: A) parásitos – anticuerpo primario de conejo anti *T. cruzi* (1:1000 en TBS/BSA) y anticuerpo secundario bovino anti conejo marcado con CFI 488 (verde, 1:1500 en TBS/BSA), B) Núcleo del fibroblasto, kinetoplastos y núcleos de los parásitos – DAPI, C) Filamentos de actina – faloidina 458 (1:10000 en TBS/BSA), D) Combinado.

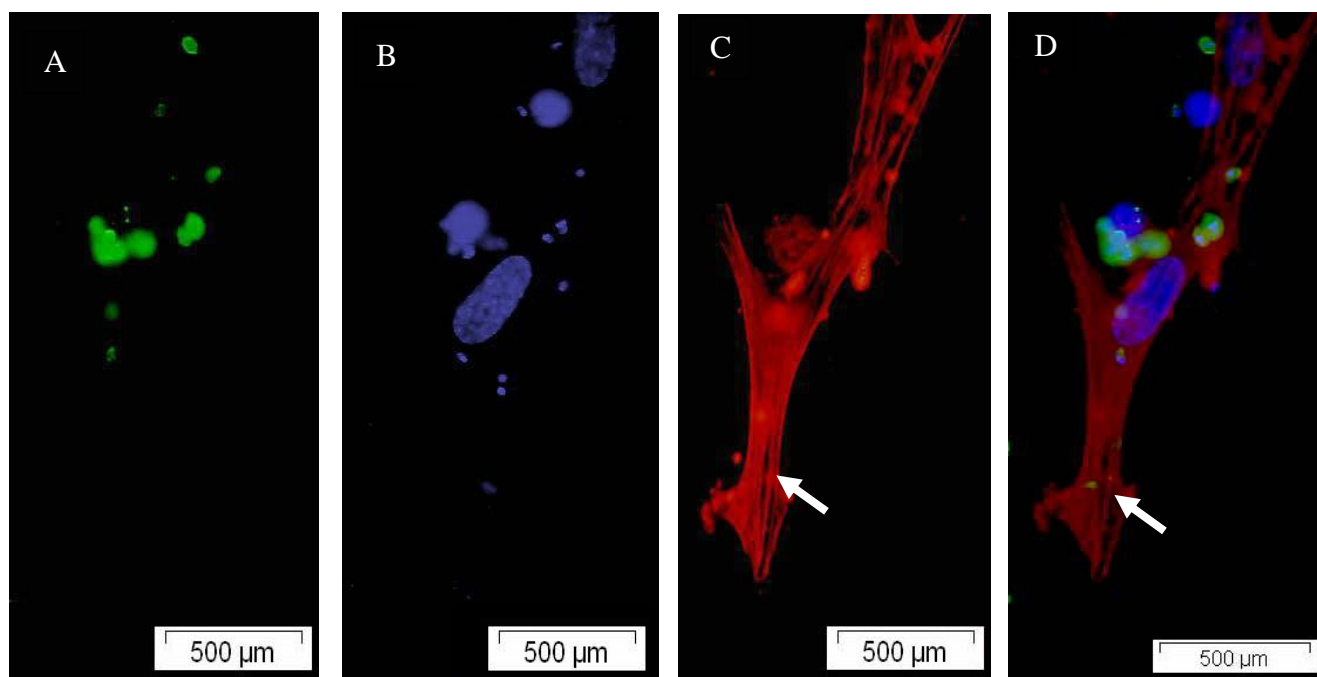


Figura 5. Filamentos de actina en un fibroblasto L929 no infectado. Fibroblasto de ratón no infectado. A) parásitos – anticuerpo primario de conejo anti *T. cruzi* (1:1000 en TBS/BSA) y anticuerpo secundario bovino anti conejo marcado con CFI 488 verde (1:1500 en TBS/BSA), B) Núcleo del fibroblasto – DAPI, C) Filamentos de actina – faloidina 458 (1:10000 en TBS/BSA), D) Combinado.

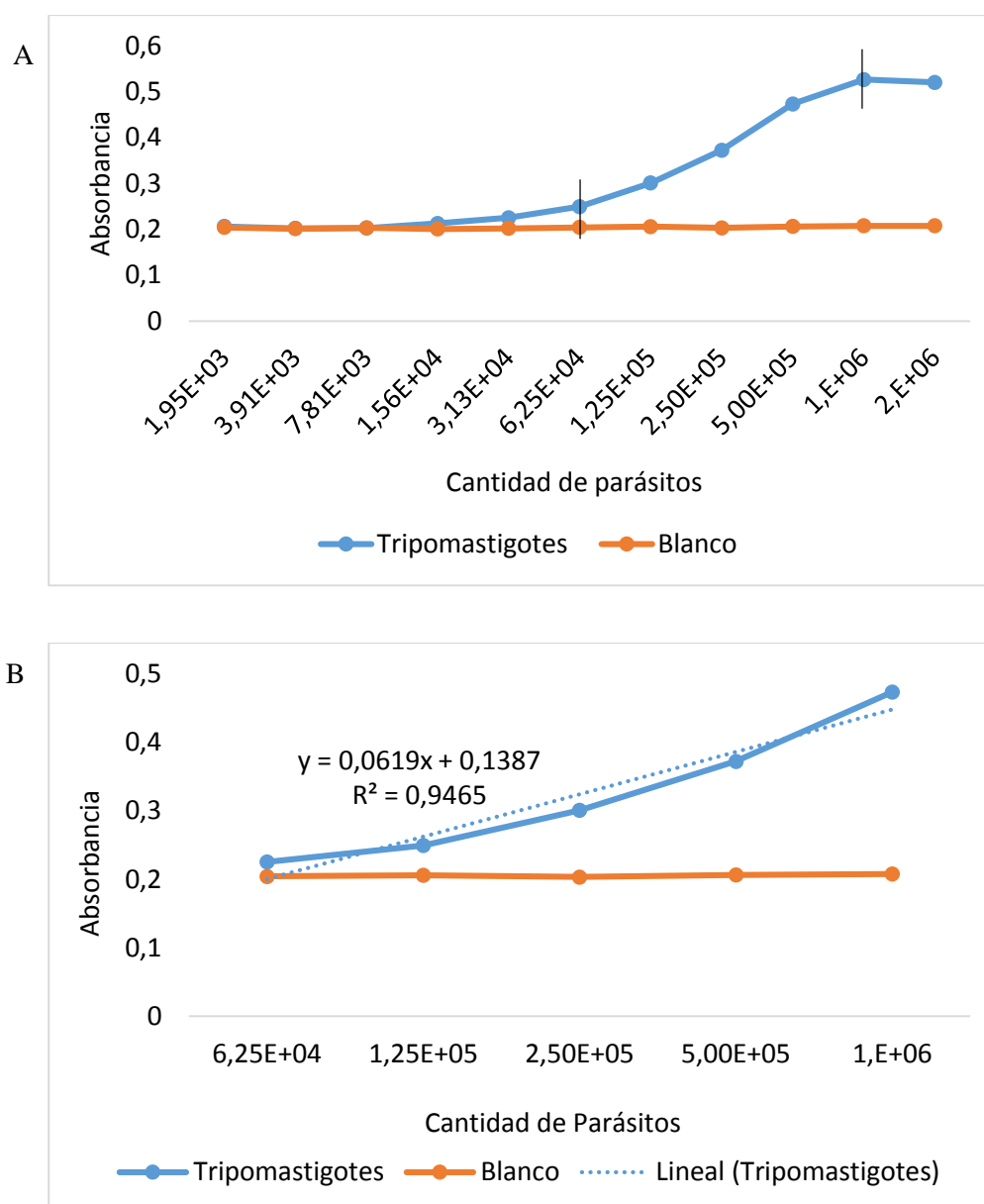


Figura 6. Curva de titulación de cantidad de parásitos con el kit CellTiter. A) En placas de 96 pocillos se realizaron diluciones seriadas de tripomastigotes de *T. cruzi* (2×10^6 – $1,95 \times 10^3$), se adicionaron 20 μ L del kit CellTiter por pocillo y se midió la absorbancia a 490 nm. B) El rango de (1×10^6 a $6,25 \times 10^4$ parásitos) permite delimitar el rango lineal de correlación entre el número de parásitos y la absorbancia medida con el kit CellTiter.

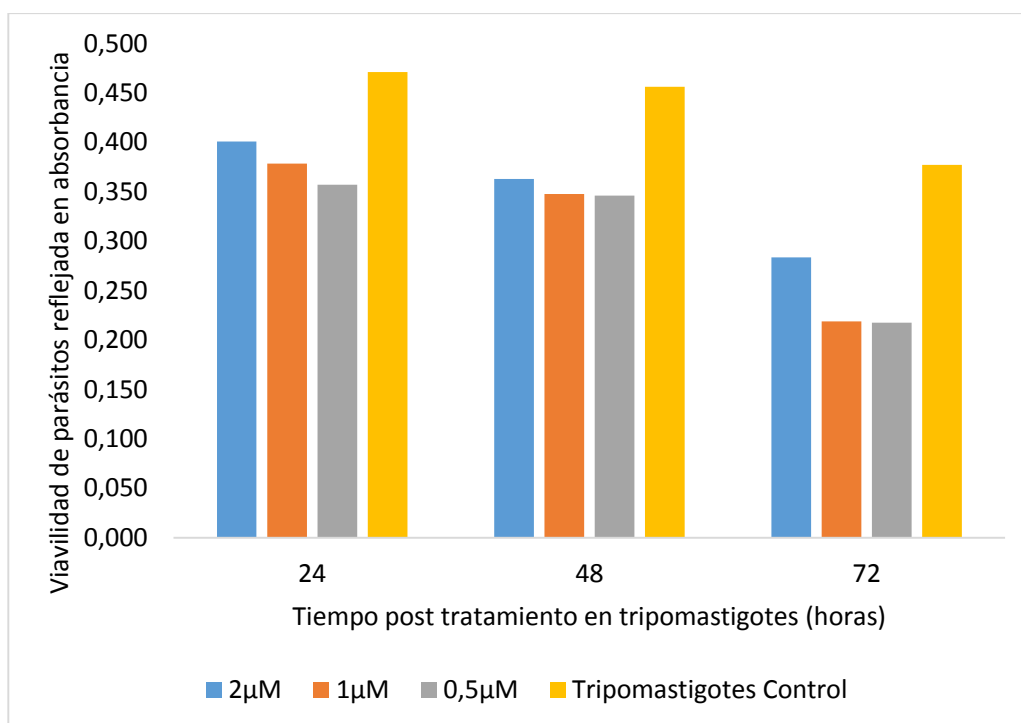
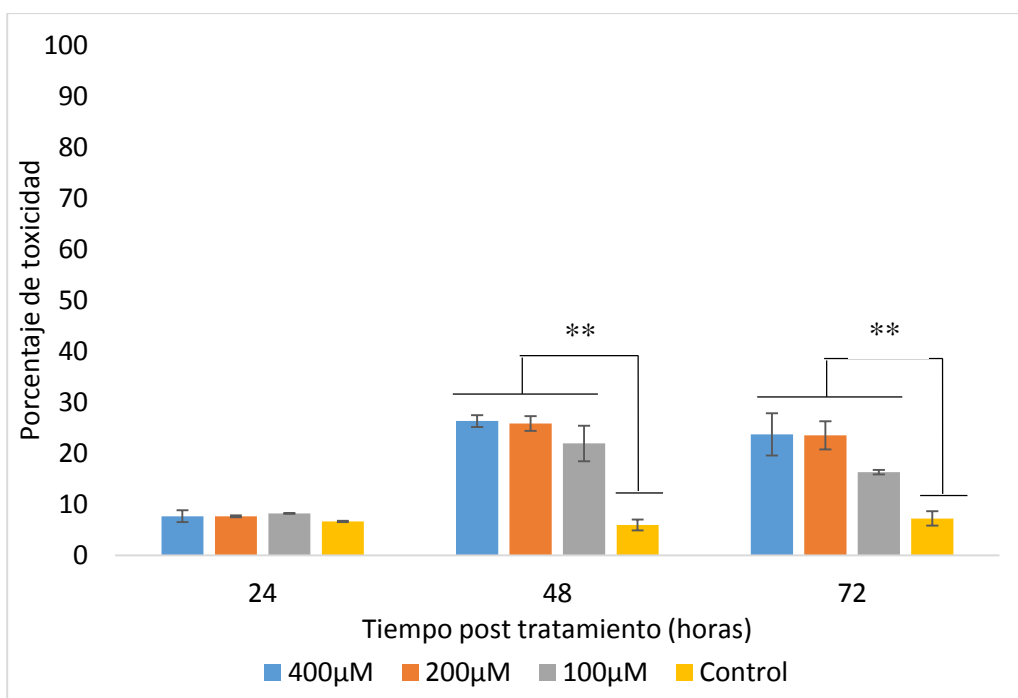


Figura 7. Toxicidad de la citocalasina sobre tripomastigotes. En una placa de 96 pocillos se colocaron 1×10^6 tripomastigotes de *T. cruzi* en presencia de citocalasina a 2 μM , 1 μM y 0,5 μM por 24, 48 y 72 horas. Se midió la absorbancia a 490 nm con el kit CellTiter. No existen diferencias significativas para las distintas concentraciones probadas.



**p<0,01

Figura 8. Citotoxicidad de la antipaina sobre células LLC-MK₂. Experimento representativo para determinación de toxicidad en células LLC-MK₂ no infectadas sembradas en placas de 96 pocillos las mismas que fueron expuestas a antipaina (400 μM, 200 μM y 100 μM) por 24, 48 y 72 horas. El porcentaje de citotoxicidad celular fue medido con el Kit Citotox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y la prueba de Tukey para cada tiempo. A las 48 y 72 horas hubo diferencias altamente significativas con respecto al control y se usó la menor concentración de 100 μM en los experimentos de egreso.

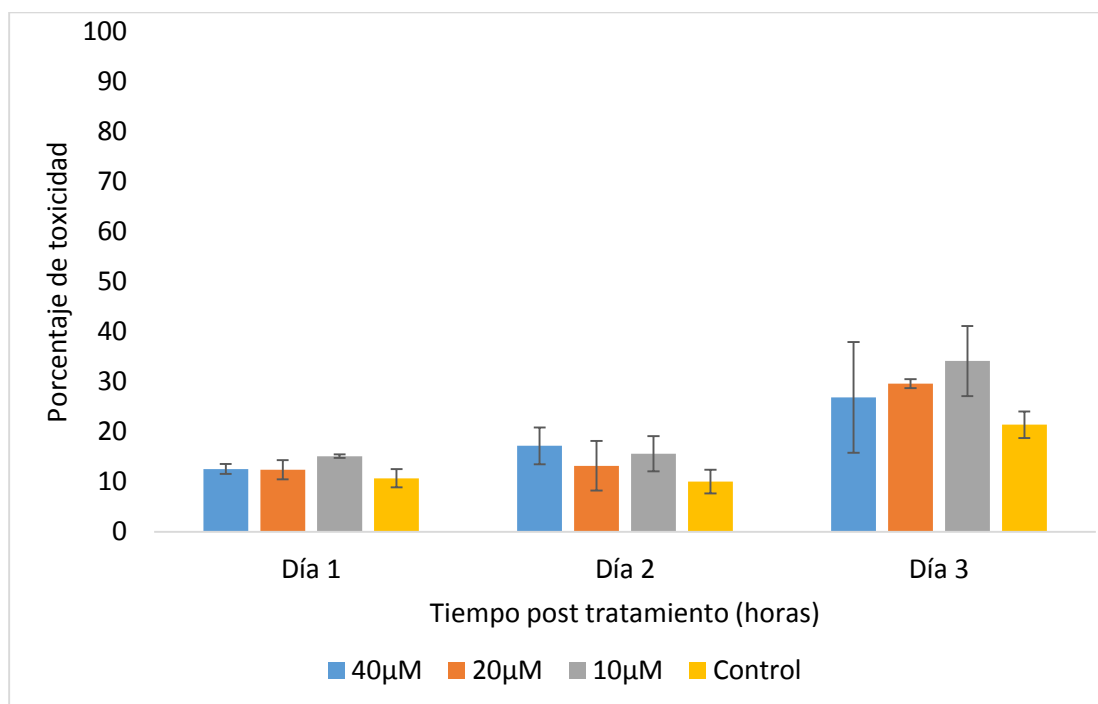
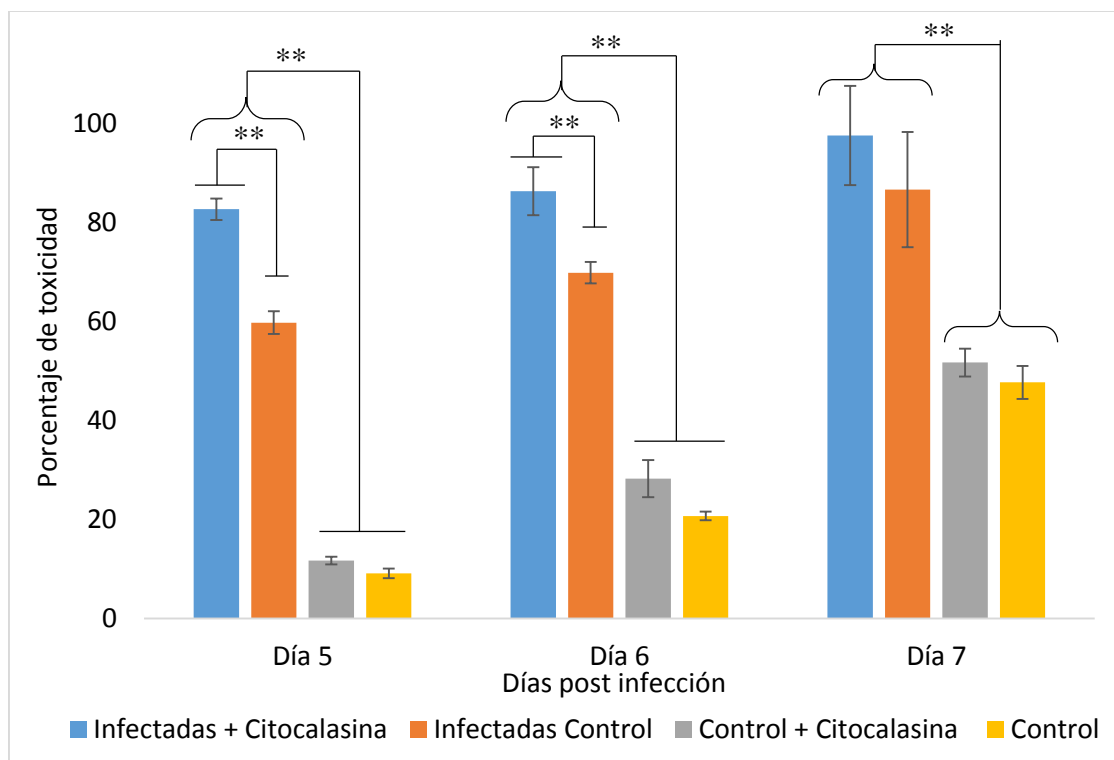


Figura 9. Citotoxicidad del fosforamidón sobre células LLc-MK₂. Experimento representativo para determinación de toxicidad en células LLc-MK₂ no infectadas en adicionadas con fosforamidón a diferentes concentraciones (40 µM, 20 µM y 10 µM) por 24, 48 y 72 horas. El porcentaje de toxicidad celular fue medido con el Kit Citotox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y la prueba de Tukey para cada tiempo. A pesar de no haber diferencias significativas para ninguno de los tratamientos con respecto al control, se utilizó la concentración de 10 µM para los experimentos de egreso.



** $p < 0,01$

Figura 10. Permeabilidad celular como indicador de egreso de *T. cruzi* en células tratadas con citocalasina. Experimento representativo en células LLC-MK₂ que fueron infectadas con $1,5 \times 10^6$ tripomastigotes de *T. cruzi* y tratadas con 2 μ M de citocalasina a las 96 horas post infección. El porcentaje de células permeables fue medido con el kit Citotox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay durante los días 5, 6 y 7 post infección y se adicionó dos controles de células no infectadas (células solas: control, células con el tratamiento: control + citocalasina). Los resultados fueron analizados mediante las pruebas de ANOVA y Tukey para cada día.

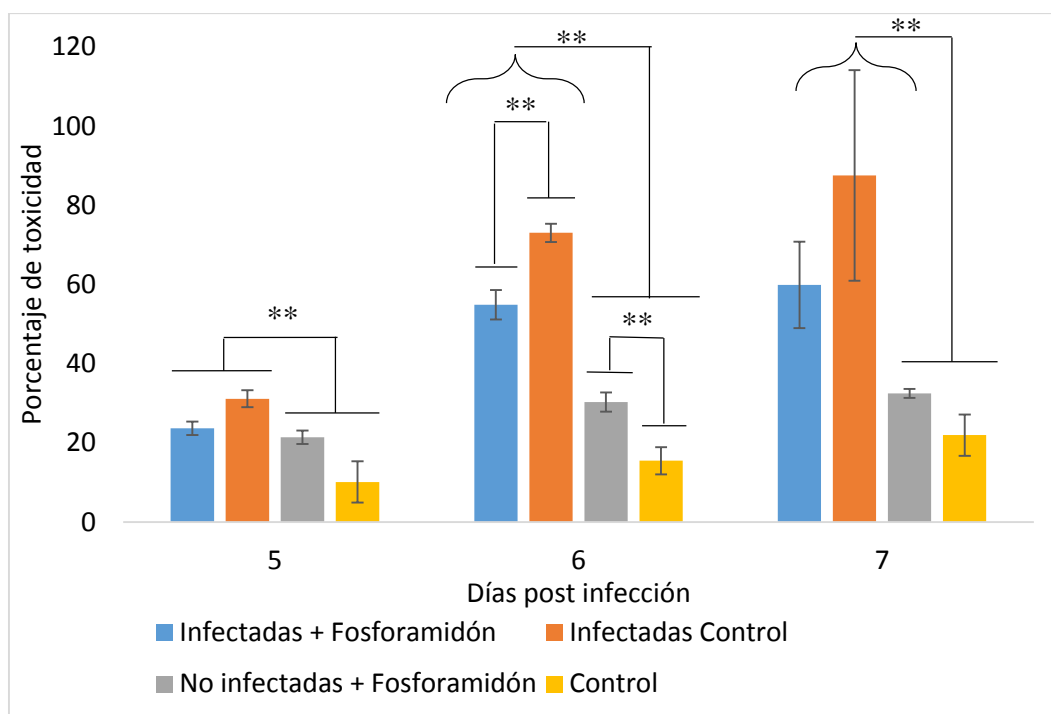
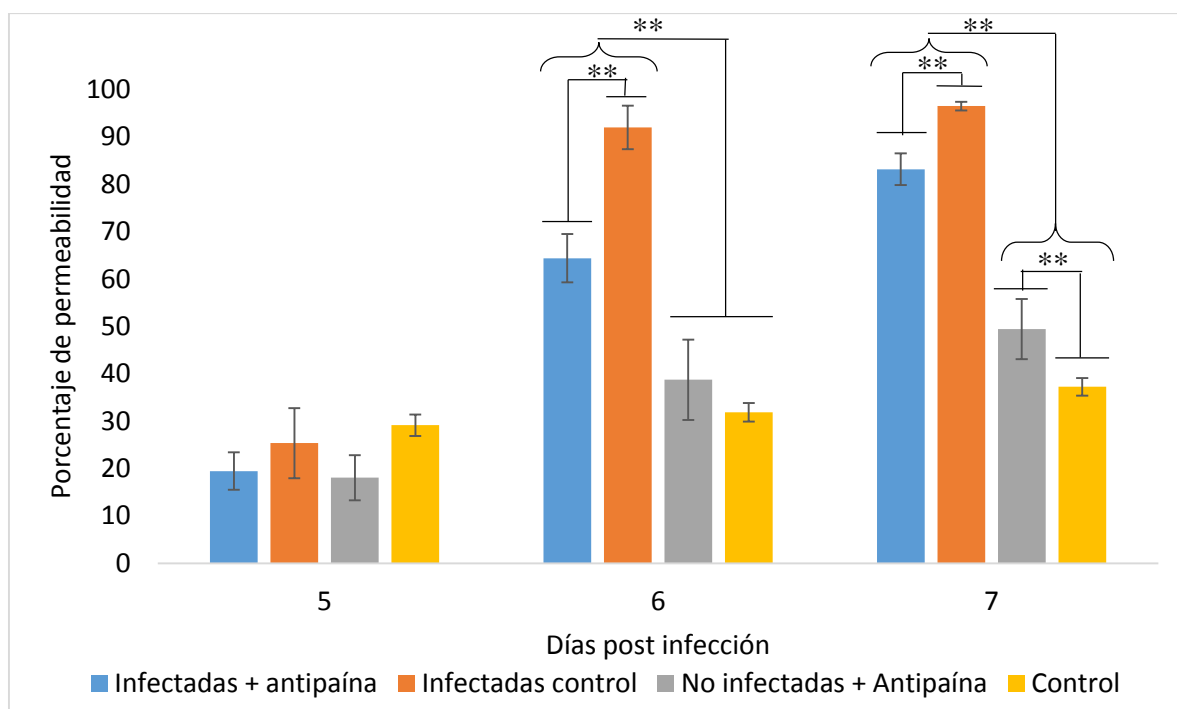


Figura 11. Permeabilidad celular como indicador de egreso de *T. cruzi* en células tratadas con fosforamidón. Experimento representativo en células LLC-MK₂ que fueron infectadas con $1,5 \times 10^6$ tripomastigotes de *T. cruzi* y tratadas con 10 μ M de fosforamidón a las 96 horas post infección. El porcentaje de células permeables fue medido con el kit Citotox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay durante los días 5, 6 y 7 post infección y se adicionó dos controles de células no infectadas (células solas: control, células con el tratamiento: no infectadas + fosforamidón). Los resultados fueron analizados mediante las pruebas de ANOVA y Tukey para cada día.



** $p < 0,01$

Figura 12. Permeabilidad celular como indicador de egreso de *T. cruzi* en células tratadas con antipaína. Experimento representativo en células LLC-MK₂ que fueron infectadas con $1,5 \times 10^6$ tripomastigotes de *T. cruzi* y tratadas con 100 μ M de antipaína a las 96 horas post infección. El porcentaje de células permeables fue medido con el kit Citotox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay durante los días 5, 6 y 7 post infección y se adicionó dos controles de células no infectadas (células solas: control, células con el tratamiento: no infectadas + antipaína). Los resultados fueron analizados mediante las pruebas de ANOVA y Tukey para cada día.

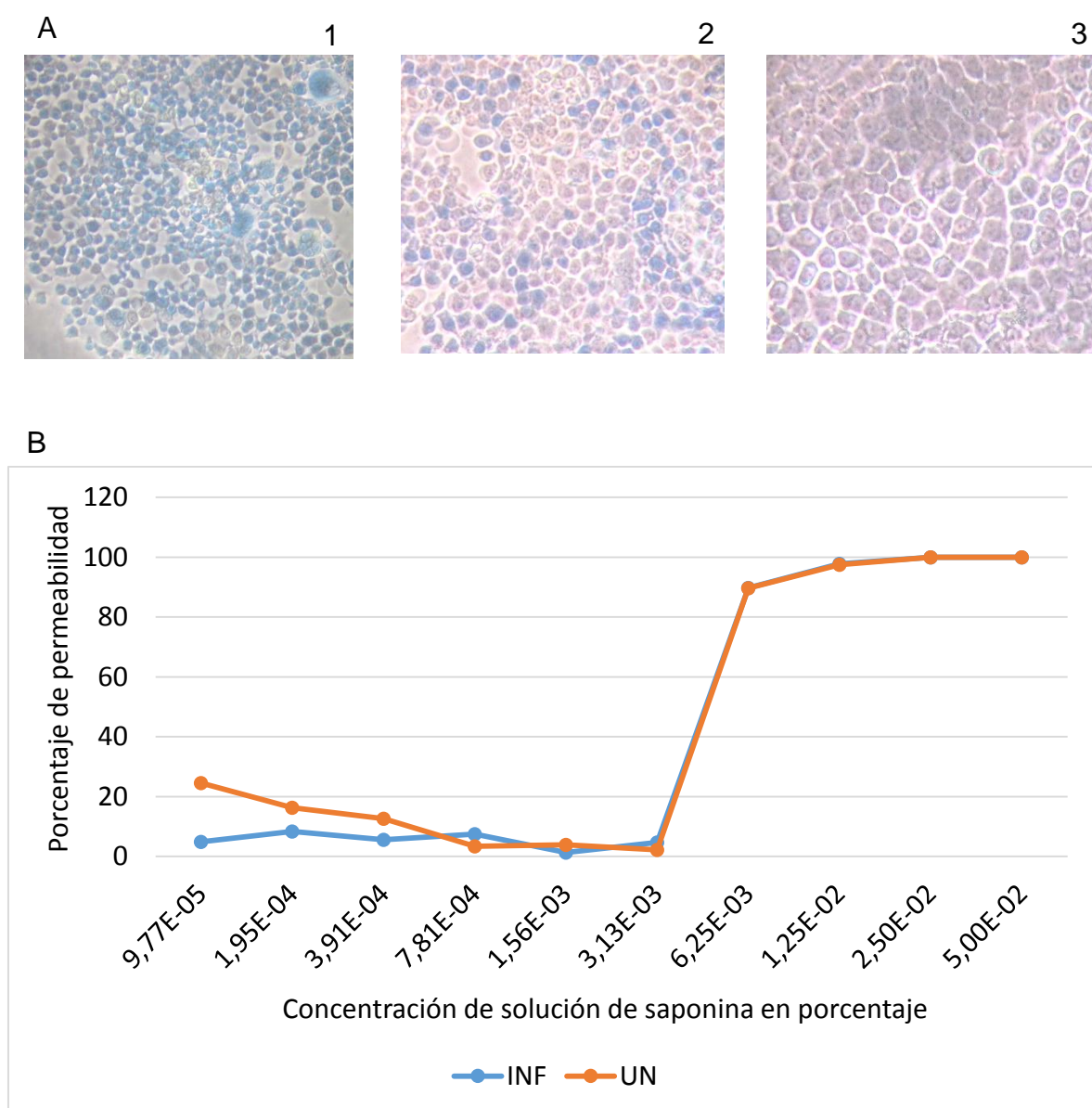
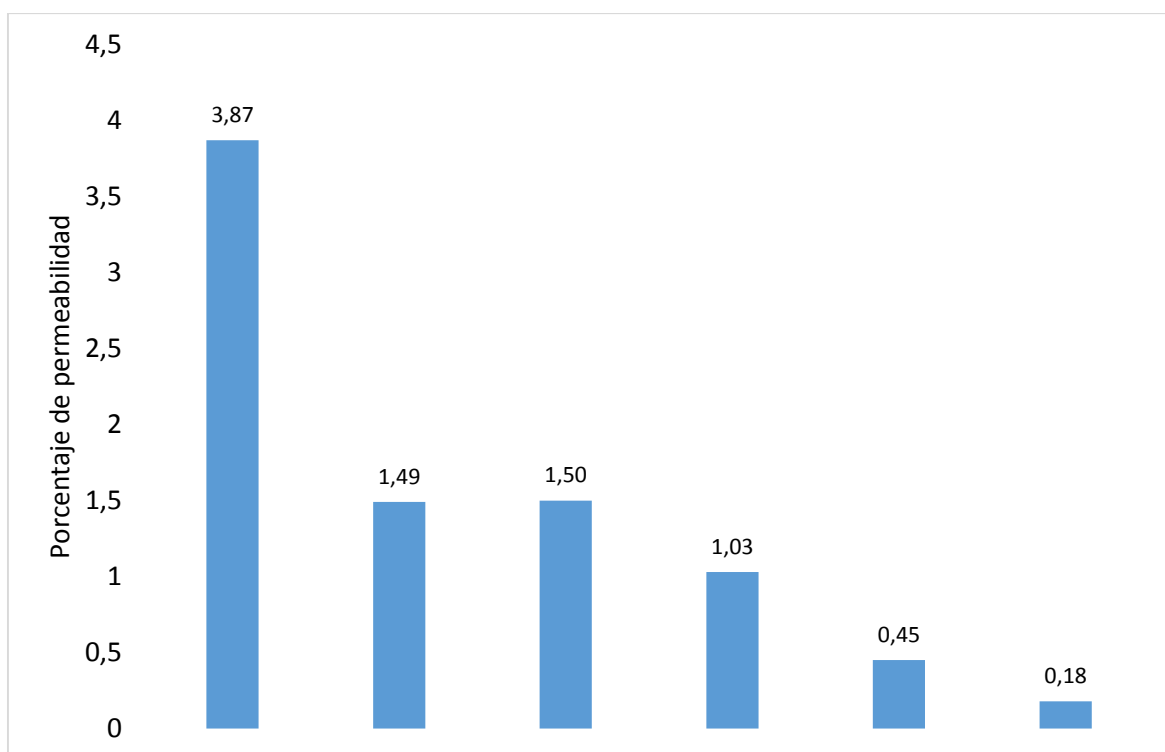


Figura 13. Permeabilidad de células infectadas y no infectadas tratadas con saponina.

Células LLC-MK₂ en placas de 96 tratadas con diferentes concentraciones de saponina. A1) Imágenes representativas de la permeabilidad de las células determinada con el uso de Trypan blue, tratadas con $5,00 \times 10^{-2}\%$ de saponina. A2) $4 \times 10^{-3}\%$. A3) $3 - 9,77 \times 10^{-5}\%$. B) Células LLC-MK₂ infectadas y no infectadas con *T. cruzi* tratadas con diferentes concentraciones de saponina en un rango de $5,00 \times 10^{-2}\%$ a $9,77 \times 10^{-5}\%$.



MEDIO	INF	UNF	Control	INF	UNF	Control
<i>T. cruzi</i>	+	+	+	-	-	-

Figura 14. Permeabilidad en células tratadas con medio de cultivo de células infectadas y no infectadas. En placas de 96 pocillos se sembraron células LLc-MK₂ infectadas y no infectadas con *T. cruzi*, se adicionó medio de cultivo tomado de frascos de células infectadas y no infectadas a las 96 horas post infección de la placa y se observó la permeabilidad de las mismas usando Trypan blue. No se muestran diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control.

10. TABLAS

Tabla 1. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con antipaína en células LLc-MK₂ para 24 horas. No existen diferencias significativas con respecto a las concentraciones, por lo tanto no es fuerte la toxicidad causada por el reactivo sobre las células a las 24 horas de colocado el inhibidor.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Concentración	Hipótesis	,009	3	,003	3,455	,168
	Error	,003	3	,001 ^a		
Repetición	Hipótesis	,002	1	,002	1,900	,262
	Error	,003	3	,001 ^a		
Concentración *	Hipótesis	,003	3	,001	.	.
Repetición	Error	,000	0	. ^b		

a. MS(Concentración * Repetición)

b. MS(Error)

Tabla 2. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con antipaína en células LLc-MK₂ para 48 horas. Existen diferencias altamente significativas con respecto a las concentraciones después de 48 horas de colocado el inhibidor.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	549,850 ^a	3	183,283	43,821	,002
Concentración	549,850	3	183,283	43,821	,002**
Error	16,730	4	4,182		
Total	566,580	7			

a. R al cuadrado =
,970 (R al cuadrado
ajustada = ,948)

Tabla 3. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con antipaína en células LLc-MK₂ para 72 horas. Existen diferencias altamente significativas con respecto a las concentraciones después de 72 horas de colocado el inhibidor.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	2873,835 ^a	4	718,459	106,458	,000
Concentración	2873,835	4	718,459	106,458	,000**
Error	26,995	4	6,749		
Total	2900,830	8			

a. R al cuadrado = ,991 (R al cuadrado ajustada = ,981)

Tabla 4. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de toxicidad en células tratadas con antipaína a las 48 horas. Se forman dos grupos uno entre las concentraciones de 100 μ M, 200 μ M y 400 μ M y otro solo del control.

Porcentaje

HSD Tukey^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto	
		1	2
Control	2	6,0000	
100 μ M	2		21,9500
200 μ M	2		25,9000
400 μ M	2		26,3500
Sig.		1,000	,278

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 4,182.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 5. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de toxicidad en células tratadas con antipaína a las 72 horas. Se forman dos grupos uno entre las concentraciones de 100 μ M, 200 μ M y 400 μ M y otro del control con la concentración de 100 μ M.

Porcentaje

HSD Tukey^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto	
		1	2
Control	2	7,2500	
100 μ M	2	16,3000	16,3000
200 μ M	2		23,5500
400 μ M	2		23,7500
Sig.		,081	,141

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 6,749.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 6. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con fosforamidón en células LLc-MK₂ para 24 horas. No existen diferencias significativas con respecto a las concentraciones, por lo tanto no es fuerte la toxicidad causada por el reactivo sobre las células a las 24 horas de colocado el inhibidor.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Concentración	Hipótesis	,010	3	,003	1,549	,296
	Error	,013	6	,002 ^a		
Repetición	Hipótesis	,011	2	,005	2,430	,169
	Error	,013	6	,002 ^a		
Concentración *	Hipótesis	,013	6	,002	.	.
Repetición	Error	,000	0	. ^b		

a. MS(Concentración * Repetición)

b. MS(Error)

Tabla 7. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con fosforamidón en células LLc-MK₂ para 48 horas. No existen diferencias significativas con respecto a las concentraciones, por lo tanto no es fuerte la toxicidad causada por el reactivo sobre las células a las 48 horas de colocado el inhibidor.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Concentración	Hipótesis	,010	3	,003	1,549	,296
	Error	,013	6	,002 ^a		
Repetición	Hipótesis	,011	2	,005	2,430	,169
	Error	,013	6	,002 ^a		
Concentración * Repetición	Hipótesis	,013	6	,002	.	.
	Error	,000	0	. ^b		

a. MS(Concentración * Repetición)

b. MS(Error)

Tabla 8. Prueba ANOVA para determinación de toxicidad con fosforamidón en células LLc-MK₂ para 72 horas. No existen diferencias significativas con respecto a las concentraciones, por lo tanto no es fuerte la toxicidad causada por el reactivo sobre las células a las 48 horas de colocado el inhibidor.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Concentración	Hipótesis	,031	3	,010	,820	,528
	Error	,077	6	,013 ^a		
Repetición	Hipótesis	,006	2	,003	,223	,807
	Error	,077	6	,013 ^a		
Concentración *	Hipótesis	,077	6	,013	.	.
Repetición	Error	,000	0	. ^b		

a. MS(Concentración * Repetición)

b. MS(Error)

Tabla 9. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin citocalasina al día 5 post infección. Existen diferencias altamente significativas con respecto a los tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	31954,777 ^a	4	7988,694	2811,957	,000
Tratamientos	31954,777	4	7988,694	2811,957	,000**
Error	22,728	8	2,841		
Total	31977,504	12			

a. R al cuadrado = ,999 (R al cuadrado ajustada = ,999)

Tabla 10. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin citocalasina al día 6 post infección. Existen diferencias altamente significativas con respecto a los tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	40770,864 ^a	4	10192,716	939,990	,000
Tratamientos	40770,864	4	10192,716	939,990	,000**
Error	86,747	8	10,843		
Total	40857,611	12			

a. R al cuadrado = ,998 (R al cuadrado ajustada = ,997)

Tabla 11. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin citocalasina al día 7 post infección. Existen diferencias altamente significativas con respecto a los tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	64314,562 ^a	4	16078,641	365,239	,000
Tratamientos	64314,562	4	16078,641	365,239	,000**
Error	352,178	8	44,022		
Total	64666,741	12			

a. R al cuadrado = ,995 (R al cuadrado ajustada = ,992)

Tabla 12. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con citocalasina en el día 5 post tratamiento. Se formaron tres grupos, uno que agrupa las células control con las células no infectadas más citocalasina; otro de las células infectadas control y un tercero de las células infectadas más el tratamiento.

Porcentaje

HSD Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto		
		1	2	3
Control	3	9,12833		
No infectadas + cyt	3	11,72000		
Infectadas control	3		59,83800	
Infectadas + cyt	3			82,76667
Sig.		,306	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 2,841.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 13. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con citocalasina en el día 6 post infección. Al igual que en el día 5 post infección se formaron tres grupos, uno que agrupa las células control con las células no infectadas más citocalasina; otro de las células infectadas control y un tercero de las células infectadas más el tratamiento.

Porcentaje

HSD Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto		
		1	2	3
Control	3	20,75800		
No infectadas + cyt	3	28,28633		
Infectadas control	3		69,93633	
Infectadas + cyt	3			86,41867
Sig.		,088	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 10,843.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 14. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con citocalasina en el día 7 post infección. Se formaron dos grupos, uno con las células infectadas control y las infectadas con el tratamiento y otro de las células no infectadas con citocalasina y las células control.

Porcentaje

HSD Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto	
		1	2
Control	3	47,80000	
No infectadas + cyt	3	51,76600	
Infectadas control	3		86,73533
Infectadas + cyt	3		94,60767
Sig.		,882	,505

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 44,022.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 15. Diferencia del porcentaje de toxicidad en células infectadas tratadas con citocalasina. De los resultados obtenidos en los ensayos de egreso celular se restó el porcentaje de toxicidad control del porcentaje de los tratamientos en los días 5, 6 y 7 post infección.

Toxicidad en células con antipaína			
Día	Día 5	Día 6	Día 7
Infectadas + Citocalasina	83	86	98
Infectadas control	60	70	87
Diferencia	23	16	11

Tabla 16. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin antipaína al día 5 post infección. Existen diferencias altamente significativas con respecto a los tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	6597,140 ^a	4	1649,285	67,380	,000
Tratamientos	6597,140	4	1649,285	67,380	,000**
Error	195,818	8	24,477		
Total	6792,958	12			

a. R al cuadrado = ,971 (R al cuadrado ajustada = ,957)

Tabla 17. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin antipaína al día 6 post infección. Existen diferencias altamente significativas con respecto a los tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	45414,906 ^a	4	11353,726	369,988	,000
Tratamientos	45414,906	4	11353,726	369,988	,000**
Error	245,494	8	30,687		
Total	45660,400	12			

a. R al cuadrado = ,995 (R al cuadrado ajustada = ,992)

Tabla 18. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin antipaína al día 7 post infección. Existen diferencias altamente significativas con respecto a los tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	60232,374 ^a	4	15058,094	1079,034	,000
Tratamientos	60232,374	4	15058,094	1079,034	,000**
Error	111,641	8	13,955		
Total	60344,016	12			

a. R al cuadrado = ,998 (R al cuadrado ajustada = ,997)

Tabla 19. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con antipaína en el día 5 post infección. Se formó un solo grupo con todas las variables (Infectadas con el tratamiento, infectadas control, no infectadas con antipaína y control)

Porcentaje

HSD Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto
		1
No infetadas + Antipaína	3	18,06100
Infectadas + Antipaína	3	19,47333
Infectadas Control	3	25,37967
Control	3	29,14633
Sig.		,095

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 24,477.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 20. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con antipaína en el día 6 post infección. Se formaron tres grupos, el primero que contiene a las células control más las células no infectadas con el tratamiento, otro grupo de las células infectadas con antipaína y un tercer grupo de las células infectadas control.

Porcentaje

HSD Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto		
		1	2	3
Control	3	31,86800		
No infetadas + Antipaína	3	38,75333		
Infectadas + Antipaína	3		64,41033	
Infectadas Control	3			92,04467
Sig.		,469	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 30,687.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 21. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con antipaína en el día 7 post infección. Se formaron cuatro grupos uno por cada variable (Células control, no infectadas más antipaína, células infectadas con el tratamiento y células infectadas control).

Porcentaje					
HSD Tukey ^{a,b}					
Tratamientos	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
Control	3	37,25267			
No infectadas + Antipaína	3		49,43700		
Infectadas + Antipaína	3			83,21233	
Infectadas Control	3				96,54733
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 13,955.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 22. Diferencia del porcentaje de toxicidad en células infectadas tratadas con antipaína. De los resultados obtenidos en los ensayos de egreso celular se restó el porcentaje de toxicidad control del porcentaje de los tratamientos en los días 5, 6 y 7 post infección.

Toxicidad en células con antipaína			
Día	Día 5	Día 6	Día 7
Infectadas + Antipaína	19	64	83
Infectadas control	25	92	97
Diferencia	6	28	14

Tabla 23. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin fosforamidón al día 5 post infección. Existen diferencias altamente significativas con respecto a los tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	6288,390 ^a	4	1572,097	167,806	,000
Tratamientos	6288,390	4	1572,097	167,806	,000**
Error	74,948	8	9,369		
Total	6363,338	12			

a. R al cuadrado = ,988 (R al cuadrado ajustada = ,982)

Tabla 24. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin fosforamidón al día 6 post infección. Existen diferencias altamente significativas con respecto a los tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	6597,140 ^a	4	1649,285	67,380	,000
Tratamientos	6597,140	4	1649,285	67,380	,000**
Error	195,818	8	24,477		
Total	6792,958	12			

a. R al cuadrado = ,971 (R al cuadrado ajustada = ,957)

Tabla 25. Prueba ANOVA para comparar egreso celular en células infectadas con y sin fosforamidón al día 7 post infección. Existen diferencias altamente significativas con respecto a los tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	38392,866 ^a	4	9598,216	44,919	,000
Tratamientos	38392,866	4	9598,216	44,919	,000**
Error	1709,429	8	213,679		
Total	40102,295	12			

a. R al cuadrado = ,957 (R al cuadrado ajustada = ,936)

Tabla 26. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con fosforamidón en el día 5 post infección. Se formaron tres grupos, uno que contiene a las células infectadas control con las células infectadas con fosforamidón; otro de las células infectadas con el tratamiento y las células infectadas control; y el tercer grupo de las células control.

Porcentaje

HSD Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto		
		1	2	3
Control	3	10,14367		
No infetadas + Fosforamidón	3		21,44667	
Infectadas + Fosforamidón	3		23,70300	23,70300
Infectadas Control	3			31,16800
Sig.		1,000	,804	,068

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 9,369.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 27. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con fosforamidón en el día 6 post infección. Se formaron cuatro grupos, uno por cada variable (células control, células no infectadas más fosforamidón, células infectadas más fosforamidón y células infectadas control)

Porcentaje					
HSD Tukey ^{a,b}					
Tratamientos	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
Control	3	15,52767			
No infetadas + Fosforamidón	3		30,35467		
Infectadas + Fosforamidón	3			54,88433	
Infectadas Control	3				73,06200
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 9,192.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 28. Prueba Post Hoc de Tukey, para ensayos de permeabilidad en células tratadas con fosforamidón en el día 7 post infección. Se formaron dos grupos, uno que contiene a las células infectadas control y las células infectadas con el tratamiento; y un segundo grupo con las células no infectadas más fosforamidón y las células control.

Porcentaje

HSD Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto	
		1	2
Control	3	21,97167	
No infetadas + Fosforamidón	3	32,52600	
Infectadas + Fosforamidón	3	59,93267	59,93267
Infectadas Control	3		87,55000
Sig.		,052	,174

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 213,679.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Tabla 29. Diferencia del porcentaje de toxicidad en células infectadas tratadas con fosforamidón. De los resultados obtenidos en los ensayos de egreso celular se restó el porcentaje de toxicidad control del porcentaje de los tratamientos en los días 5, 6 y 7 post infección.

Diferencia del porcentaje de toxicidad por día post infección con fosforamidón			
Día	Día 5	Día 6	Día 7
Infectadas + Fosforamidón	24	55	60
Infectadas control	31	73	88
Diferencia	7	18	28

Tabla 30. Prueba ANOVA para determinación de permeabilidad en células infectadas tratadas con medio de cultivo de células infectadas y medio de células no infectadas.

No existen diferencias significativas entre tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	1,727 ^a	6	,288	4,573	,017
Infeccion	,353	1	,353	5,613	,039
Tratamientos	,424	3	,141	2,246	,146
Infeccion * Tratamientos	,000	1	,000	,002	,966
Error	,629	10	,063		
Total	2,357	16			

a. R al cuadrado = ,733 (R al cuadrado ajustada = ,573)

Tabla 31. Prueba de significación Tukey para determinación de permeabilidad en células infectadas tratadas con medio de cultivo de células infectadas y medio de células no infectadas. Se formaron dos grupos que agrupan a las células infectadas con las no infectadas, mostrando que las diferencias no están con respecto a los tratamientos sino a la infección.

Porcentaje

HSD Tukey^{a,b,c}

Tratamientos	N	Subconjunto	
		1	2
No Infectadas Control	3	-,3433	
DMEM No Infectadas	4	,1727	,1727
Infectadas Control	3		,2870
DMEM Infectadas	6		,3174
Sig.		,076	,860

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

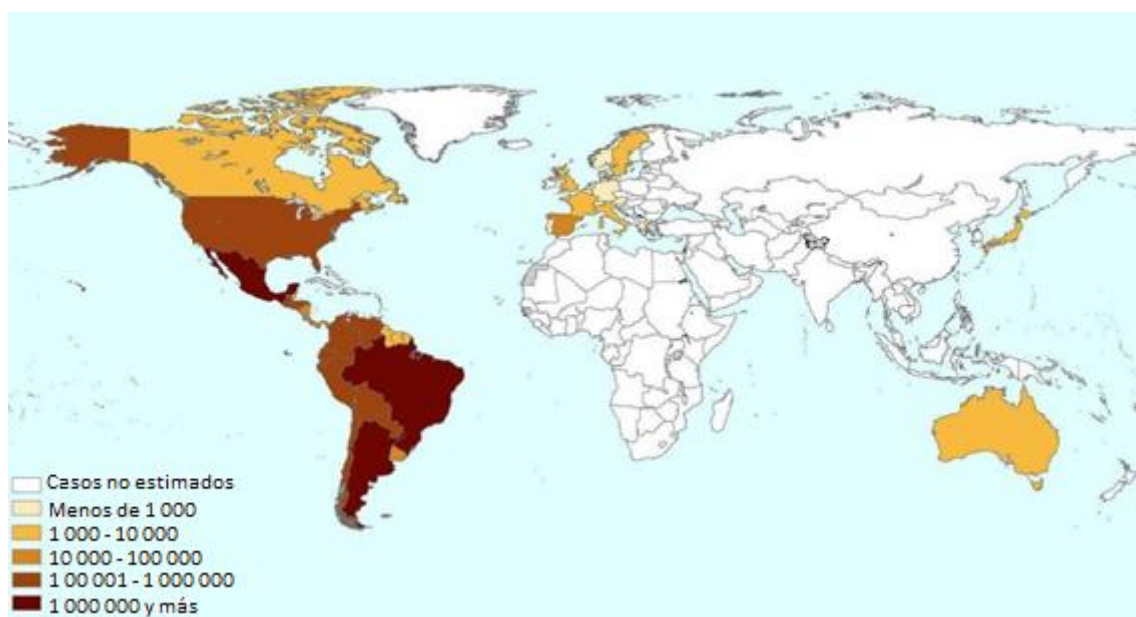
El término de error es la media cuadrática(Error) = ,063.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,692.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Alfa = ,05.

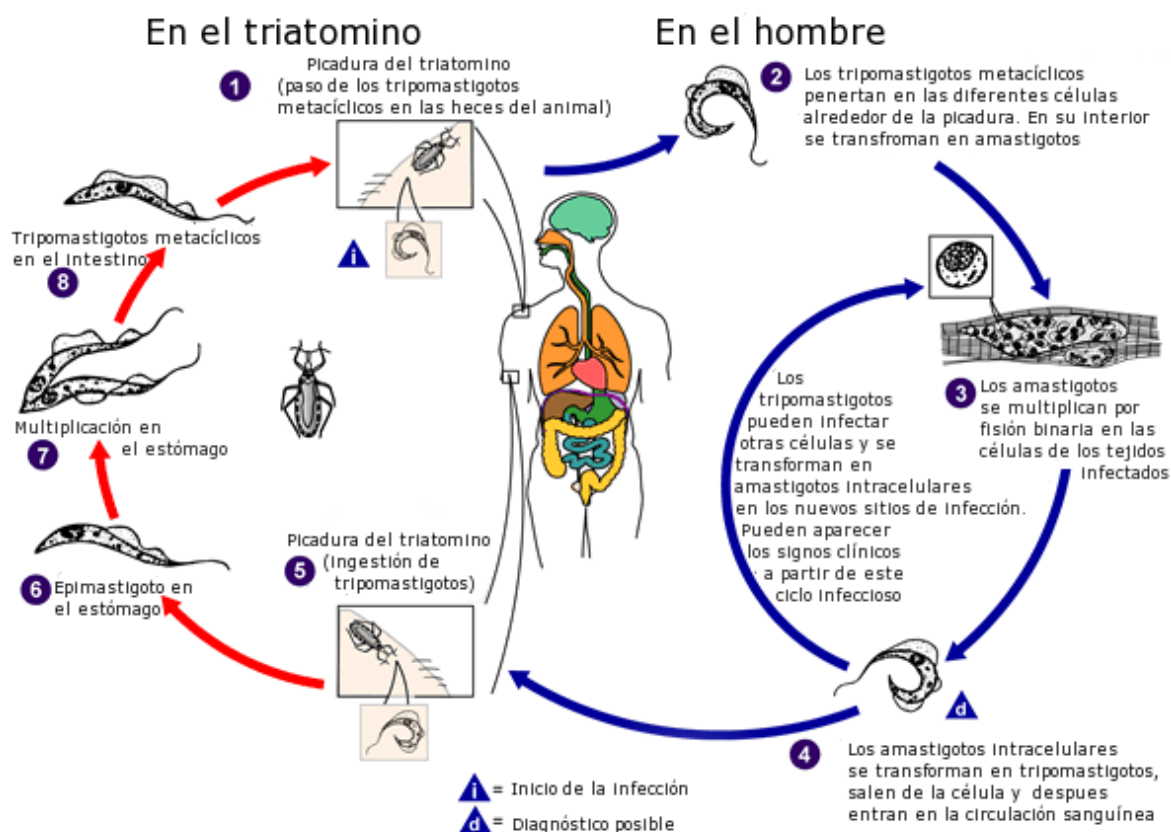
11. ANEXOS



Anexo 1. Epidemiología de la enfermedad de Chagas. Número de casos de tripanosomiasis americana a nivel mundial según la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2015).



Anexo 2. Vector de la enfermedad de Chagas. Diferentes estadios de desarrollo del principal vector de la enfermedad de Chagas en Ecuador, *Rhodnius ecuadoriensis* (Yumiseva, 2014).



Anexo 3. Ciclo de vida de *T. cruzi*. El parásito infecta al hospedero mamífero a partir de las heces de un triatomino infectado, las cuales contienen tripomastigotos metacíclicos y son depositadas junto a la picadura. Los tripomastigotos metacíclicos ingresan en las células cercanas a la picadura donde se transforman en amastigotes para replicarse por fisión binaria; luego vuelven a transformarse en tripomastigotes, salen de las células y pueden entrar en el sistema circulatorio para poder ser capturados por un triatomino a través de la picadura. En el tracto digestivo del triatomino, los parásitos se transforman en epimastigotes que se multiplican por fisión binaria. Finalmente, en el tracto digestivo posterior del triatomino, los parásitos se transforman en tripomastigotes metacíclicos, los mismos que son evacuados junto en las heces y se reinicia el ciclo (CDC, 2015).

Anexo 4. Mapa de la placa con células infectadas y no infectadas. Placa de 96 pocillos con células LLcKM₂ infectadas y no infectadas para la realización de experimentos de egreso celular. Los bordes de la placa contienen PBS para evitar el evaporamiento del medio de cultivo en los pocillos de análisis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	PBS	PBS
C	PBS	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Cell LL + <i>T.</i> <i>cruzi</i>	PBS	PBS
D	PBS	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	PBS	PBS
E	PBS	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	PBS	PBS
F	PBS	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	Células LL	PBS	PBS
G	PBS	Medio D2%	Medio D2%	Medio D2%	Medio D2%	Medio D2%	Medio D2%	Medio D2%	Medio D2%	Medio D2%	PBS	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Cell LL + *T. cruzi*: Células de la cepa LLcKM₂ más tripomastigotes de *T. cruzi*, Células LL: Células no infectadas de la cepa LLcKM₂, Medio D2%: Medio de cultivo DMEM 2% para blanco.

Anexo 6. Mapa de placa para toxicidad de citocalasina en tripomastigotes de *T. cruzi*.

En placas de 96 se colocó 1×10^6 parásitos tripomastigotes por pocillo (Tripos), se adicionó 2 μ M, 1 μ M y 0,5 μ M de citocalasina. Finalmente se leyó la placa a 490 nm durante 24, 48 y 72 horas colocando 20 μ L del kit a las 24, 48 y 72 horas post tratamiento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		24 h			48 h			72 h				
B		Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit		
C		Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit	Tripos + Cit		
D		Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control		
E		Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control	Tripos control		
F		Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco		
G		Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco		
H		2 μ M	1 μ M	0,5 μ M	2 μ M	1 μ M	0,5 μ M	2 μ M	1 μ M	0,5 μ M		

Anexo 7. Mapa de la placa para prueba de toxicidad, células tratadas con antipaína y fosforamidón. Placa de 96 pocillos con células LLcKM₂ para la realización de experimentos de toxicidad. Los bordes de la placa contienen PBS para evitar el evaporamiento del medio de cultivo en los pocillos de análisis.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		24 h			48 h			72 h				
B		Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Blanco	
C		Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Cell + Ant	Blanco	
D		Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Blanco	
E		Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Cell + Fosf	Blanco	
F		Cell + D10%	Cell + D10%	Cell + D10%	Cell + D10%	Cell + D10%	Cell + D10%	Cell + D10%	Cell + D10%	Cell + D10%	Blanco	
G		Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Blanco	
H		1:1	1:2	1:4	1:1	1:2	1:4	1:1	1:2	1:4		

Cell + Ant: Células más Antipaína, Cell + Fosf: Células más Fosforamidón, Cell + D10%: Células más DMEM 10%, Un

Lisis: lisis total de las células

Anexo 8. Mapa de células infectadas para experimento de egreso celular, tratada con antipaína, fosforamidón o citocalasina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Día 5			Día 6			Día 7				
B		Inf +D2%	Inf +D2%	Inf +D2%	Inf +D2%	Inf +D2%	Inf +D2%	Inf +D2%	Inf +D2%	Inf +D2%		
C		Inf + Trat	Inf + Trat	Inf + Trat	Inf + Trat	Inf + Trat	Inf + Trat	Inf + Trat	Inf + Trat	Inf + Trat		
D		Un + Trat	Un + Trat	Un + Trat	Un + Trat	Un + Trat	Un + Trat	Un + Trat	Un + Trat	Un + Trat		
E		Cell solas	Cell solas	Cell solas	Cell solas	Cell solas	Cell solas	Cell solas	Cell solas	Cell solas		
F		Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis	Un Lisis		
G		Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco		
H												

Inf + D2%: Células infectadas más DMEM 2%, Inf + Trat: Célula infectadas más uno de los tratamientos (antipaína, fosforamidón y citocalasina), Cell solas: Células no infectadas control, Un Lisis: lisis total de las células.

Anexo 9. Medio de cultivo adicionado con saponina al 0,05% en peso: volumen.

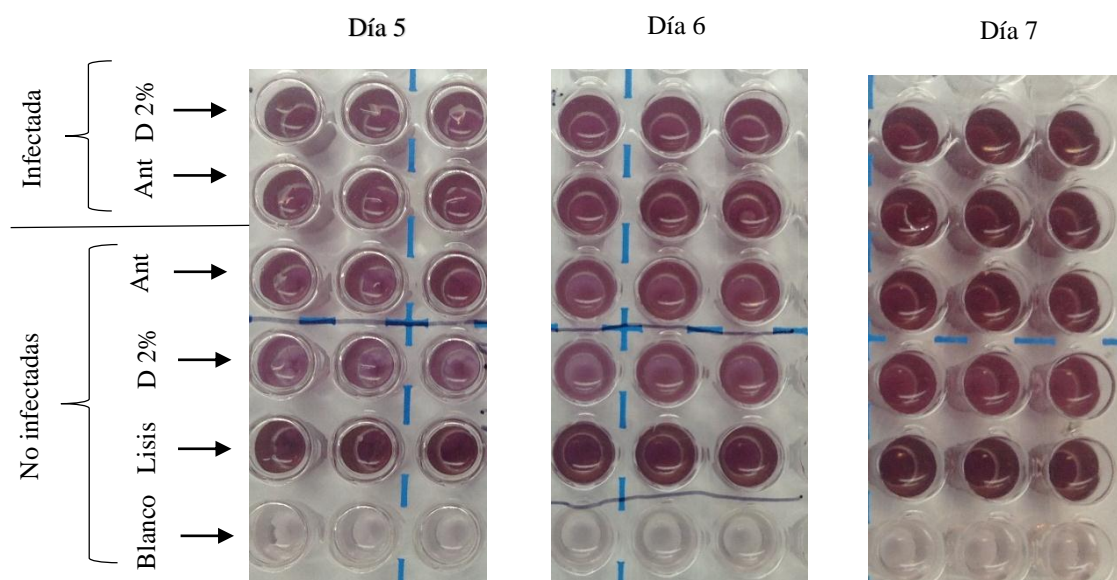
En medio de cultivo DMEM 2% FBS sin rojo fenol se colocó 0,05% de saponina (peso: volumen), por lo tanto por cada 100 mL de DMEM Clear 2% FBS se pesan 0,05 gr de saponina. Para la preparación de DMEM sin rojo fenol 2% se pesaron 13,4 gr de medio de cultivo modificado por Dulbecco sin rojo fenol y 3,7 gr de bicarbonato de sodio y se disolvieron ambos solutos en 1000 mL de agua ultra pura, se ajustó el pH a 7.2; posteriormente, dentro de la cámara de bioseguridad se adicionó antibiótico al 5%, piruvato de sodio al 5%, y suero fetal bovino al 2%. Finalmente, se filtró la solución para mantener el máximo de esterilidad del medio.

Anexo 11. Mapa de células infectadas para experimento con medio de cultivo de frascos de células infectadas y no infectadas. En placas de 96 pocillos se sembraron células LLC-MK₂, algunas de las cuales fueron infectadas y otras no. Las células fueron tratadas con medio de cultivo tomado de frascos de células infectadas y no infectadas, de acuerdo al mapa a continuación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		INF + DMEM INF	INF + DMEM INF	INF + DMEM INF								
C		INF + DMEM UN	INF + DMEM UN	INF + DMEM UN								
D		INF + NADA	INF + NADA	INF + NADA								
E		UN + DMEM UN	UN + DMEM UN	UN + DMEM UN								
F		UN + DMEM INF	UN + DMEM INF	UN + DMEM INF								
G		UN + NADA	UN + NADA	UN + NADA								

INF + DMEM INF: células infectadas más medio de cultivo de células infectadas, INF + DMEM UN: células infectadas más medio de cultivo de células no infectadas, INF + NADA: células infectadas control, UN + DMEM UN: células no infectadas más medio de cultivo de células no infectadas, UN + DMEM INF: células no infectadas más medio de cultivo de células infectadas, UN + NADA: células no infectadas control.

Anexo 12. Placa de experimento para egreso celular, células infectadas tratada con antipaína. Lectura de absorbancia a 490 nm de una placa de células infectadas y no infectadas, tratadas con antipaína para los días 5, 6 y 7 post infección.



Anexo 13. Placa de experimento para egreso celular, células infectadas tratada con citocalasina. Lectura de absorbancia a 490 nm de una placa de células infectadas y no infectadas, tratadas con citocalasina para los días 5, 6 y 7 post infección

